

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2004年5月13日 (13.05.2004)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2004/040019 A1(51)国際特許分類⁷: C12Q 1/68, C12N 15/09, G01N 33/53, 33/566

(21)国際出願番号: PCT/JP2003/013856

(22)国際出願日: 2003年10月29日 (29.10.2003)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願 2002-314776
2002年10月29日 (29.10.2002) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼

玉県 和光市 広沢2番1号 Saitama (JP). 株式会社ダナフォーム (K.K.DNAFORM) [JP/JP]; 〒108-0073 東京都 港区 三田1丁目3番35号 Tokyo (JP). 湧永製薬株式会社 (WAKUNAGA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒532-0003 大阪府 大阪市 淀川区 宮原四丁目5番36号 Osaka (JP).

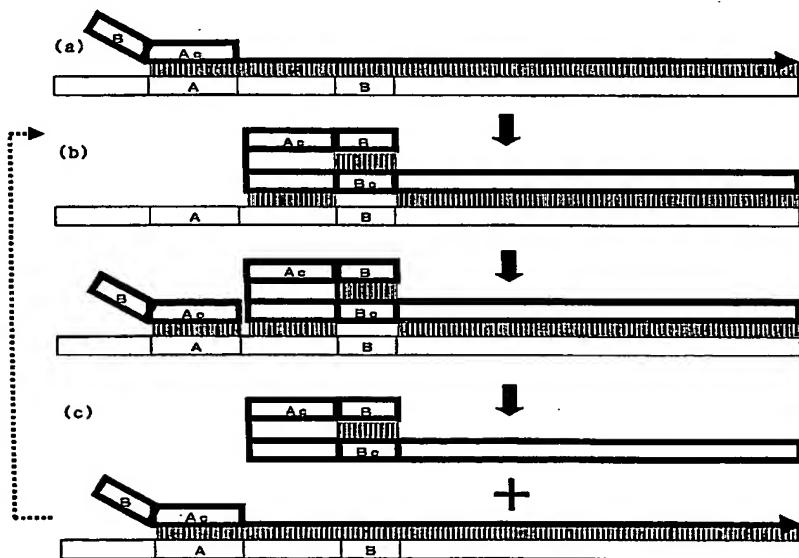
(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 三谷 康正 (MITANI,Yasumasa) [JP/JP]; 〒739-1105 広島県 高田郡 甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社内 Hiroshima (JP). 山根 明男 (YAMANE,Akio) [JP/JP]; 〒739-1105 広島県 高田郡 甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社内 Hiroshima (JP). 柴田 裕子 (SHIBATA,Yuko) [JP/JP]; 〒300-0332 茨城県 稲敷郡 阿見町中央8-3-1 株式会社ダナフォーム内 Ibaraki (JP). 林崎 良英 (HAYASHIZAKI,Yoshihide) [JP/JP]; 〒305-0061 茨城県 つくば市 稲荷前22-8 Ibaraki (JP).

[統葉有]

(54) Title: METHOD OF AMPLIFYING NUCLEIC ACID

(54)発明の名称: 核酸の増幅法



WO 2004/040019 A1

(57) Abstract: A method of efficiently synthesizing or amplifying a nucleic acid containing a target nucleic acid sequence. In this method, use is made of a primer which contains in its 3'-terminal part a sequence (Ac') hybridizable with the 3'-terminal sequence (A) of a target nucleic acid sequence and further contains in its 5'-side a sequence (B') hybridizable with a sequence (Bc) complementary to a sequence (B) located in the 5'-side of the above-described sequence (A) in the target nucleic acid sequence. In the above primer, $\{X-(Y-Y')\}/X$ ranges from -1.00 to 1.00 wherein X represents the number of bases in the above-described sequence (Ac'), Y represents the number of bases in the region located between the above-described sequence (A) and the above-described sequence (B) in the target nucleic acid sequence, and Y' represents the number of bases in the insert sequence between the above-described sequence (Ac') and the above-described sequence (B'), provided that Y' may be 0.

[統葉有]

BEST AVAILABLE COPY



- (74) 代理人: 吉武 賢次, 外(YOSHITAKE,Kenji et al.); 〒100-0005 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 本発明は、標的核酸配列を含む核酸を効率的に合成または増幅する方法に関するものである。本発明による方法においては、標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含んでなり、標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含んでなるプライマーであって、前記配列(Ac')の塩基数をXとし、標的核酸配列中における前記配列(A)と前記配列(B)に挟まれた領域の塩基数をYとし、前記配列(Ac')と前記配列(B')との間の介在配列の塩基数をY' (Y'は0であり得る)としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X \geq -1.00 \sim 1.00$ の範囲にあるプライマーを使用する。

明細書

核酸の増幅法

[発明の背景]

発明の分野

本発明は、遺伝子工学分野において有用な核酸配列の合成法および増幅法に関するものであり、より詳細には、鎖置換反応を利用した核酸配列の合成法および増幅法に関するものである。

背景技術

遺伝子工学分野においては、遺伝的な特徴を直接的に分析しうる方法として、核酸配列の相補性に基づく分析が知られている。このような分析では、試料中に存在する目的遺伝子量が少ない場合には、一般にその検出が容易ではないため、目的遺伝子そのものを予め増幅することが必要となる。

目的遺伝子の増幅（核酸増幅）は、主に、DNAポリメラーゼを利用した酵素的方法により行われる。このような酵素的方法の主要なものとしては、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR法；米国特許第4683195号明細書、米国特許第4683202号明細書および米国特許第4800159号明細書）、さらには、PCR法と逆転写酵素反応を組合わせた逆転写PCR法（RT-PCR法；Trends in Biotechnology 10, pp146-152, 1992）がある。これらの方法は、鑄型となる二本鎖核酸の一本鎖核酸への解離（変性）、一本鎖核酸へのプライマーのアニーリング、およびプライマーからの相補鎖合成（伸長）の3つの段階からなる反応を繰り返すことにより、DNAまたはRNAからの目的遺伝子の増幅を可能とするものである。これらの方法では、反応溶液を上記3段階のそれぞれに適した温度に調節する計3工程の繰り返しが必要とされる。

上記の核酸増幅法において工程数を2工程とする改良法としては、シャトルPCR法（「PCR法最前線」、蛋白質核酸酵素別冊、共立出版、第41巻、第5号、425頁～428頁（1996））が知られている。シャトルPCR法では、PCR法における3段階の反応のうち、プライマーのアニーリングおよび

伸長の2段階が同一温度で行われるため、計2工程の反応により目的遺伝子を増幅することが可能となる。さらに、欧州特許出願公開第0320308号明細書には、リガーゼ連鎖反応法（LCR法）が開示されており、該方法では、耐熱性のDNAリガーゼを用いて2工程の温度サイクリング反応（加熱と冷却の繰り返し反応）を行うことにより既知の遺伝子配列が増幅される。

以上に記載した方法においては、広い温度範囲で、かつ、厳密な温度制御を経時的に行なうことのできる高価なサーマルサイクラーを使用することが必要となる。また、該反応は、2種類～3種類の温度条件で行なうために、各反応温度に調整するための時間が必要であり、サイクル数が増えれば増えるほど、それに要する時間は増大する。

上記問題点を解決すべく、等温状態で実施可能な核酸増幅法が開発されている。このような方法としては、例えば、特公平7—114718号公報に記載の鎖置換型増幅（SDA；strand displacement amplification）法、自立複製（3SR；self-sustainedsequence replication）法、日本国特許第2650159号公報に記載の核酸配列増幅（NASBA；nucleic acid sequence based amplification）法、TMA(transcription-mediated amplification)法、日本国特許第2710159号公報に記載のQペータレプリカーゼ法、米国特許第5824517号明細書、国際公開第99/09211号パンフレットまたは国際公開第95/25180号パンフレットに記載の種々の改良SDA法、国際公開第00/28082号パンフレットに記載のランプ法（Loop-Mediated Isothermal Amplification）、国際公開第02/16639号パンフレットに記載のアイキヤン法（Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids）等が挙げられる。これらの等温核酸増幅法に関する全段階の反応は一定の温度に保たれた反応混合物中で同時に進行する。

SDA法では、最終的にDNAが増幅される系において、DNAポリメラーゼと制限エンドヌクレアーゼが介する二本鎖の置換により、試料中の目的核酸（およびその相補鎖）の増幅が可能となる。該方法では、4種類のプライマーが必要とされ、その内の2種類は、制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含むように設計する必要がある。また、該方法では、核酸合成のための基質として、修飾され

たデオキシヌクレオチド3'リン酸、例えば3'リン酸部分の α 位のリン酸基の酸素原子が硫黄原子(S)に置換されたデオキシヌクレオチド3'リン酸が必要とされる。従って、該方法は、高いランニングコストを必要とする。さらに該方法では、増幅された核酸断片中に修飾ヌクレオチド、たとえば α S置換デオキシヌクレオチドが含まれるため、例えば、増幅断片を制限酵素断片長多型(RFLP; restriction enzyme fragment length polymorphism)解析に供しようとする場合に、該増幅断片が制限酵素で切断できないことがあり、よって、そのような解析を実施できない場合がある。

米国特許第5 8 2 4 5 1 7号明細書に記載の改良SDA法は、RNAとDNAから構成され、3'末端側がDNAであるキメラプライマーを必要とする。そのようなRNAとDNAから構成されるキメラプライマーはその合成にかかる費用が高く、また、RNAを含むプライマーはその取り扱いに専門的な知識を必要とする。また、国際公開第9 9 / 0 9 2 1 1号パンフレットに記載の改良SDA法は、5'突出末端を生じさせる制限酵素を必要とし、さらに、国際公開第9 5 / 2 5 1 8 0号パンフレットに記載の改良SDA法は、少なくとも2組のプライマ一対を必要とするため、これらの方法は高いランニングコストを必要とする。

アイキャン法では、RNAとDNAから構成され、3'末端側がRNAであるキメラプライマー、さらには、そのプライマーの3'末端のRNA部分を切断するRNase Hが必要とされるため、必要な試薬のための費用が高価となる。そのため、この方法は、特に大量のサンプルについての遺伝子検査等において、高いランニングコストを必要とする。

ランプ法では、4種類のプライマーが必要とされ、それらが6個所の領域を認識することにより、目的遺伝子の増幅が可能となる。すなわち、この方法では、まず、第一のプライマーが鑄型鎖にアニーリングして伸長反応が起こり、この第一のプライマーの構成に起因して伸長鎖の5'末端部分でステムーループ構造が形成される。次に、第一のプライマーよりも上流側に設計された第二のプライマーによる鎖置換反応により第一のプライマーによる伸長鎖が鑄型鎖から分離する。これと同様の反応が二本鎖核酸のもう一方の鎖についても行なわれ、これらの反応が繰り返されることにより、標的核酸が増幅される。従って、ランプ法では増

幅反応の作用機序が複雑となり、さらには必ず6個所の領域を選定しなければならないため、プライマーの設計が困難となる。また、4種類のプライマーのうち、2種類は比較的長鎖のプライマーが必要とされるため、プライマーの合成およびその精製に費用と時間がかかる。

従って、低いランニングコストで実施でき、かつ得られた核酸断片をさらに遺伝子工学的な処理に使用することを可能とする核酸増幅法が求められている。特に、一対のプライマーで速やかに増幅可能な等温核酸増幅法が望まれる。

[発明の概要]

本発明者らは、鎖置換反応を利用した核酸の増幅法において、該方法に使用される、プライマーの伸長によってステムループ形成可能なプライマーを特定の条件を満たすように設計することにより、1種のプライマーを用いて標的核酸配列と相補的な核酸配列を含む核酸を合成でき、さらには、2種のプライマーを用いて効率的に標的核酸を増幅できることを見出した。本発明はこのような知見に基づくものである。

従って、本発明は、標的核酸配列を含む核酸を効率的に合成または増幅する方法、ならびにこれらの方に用いられるプライマーまたはプライマーセットを提供することを目的とする。

そして、本発明による核酸合成法は、鑄型核酸中の標的核酸配列と相補的な核酸を合成する方法であって、

(a) 標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含んでなり、標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含んでなるプライマーであって、

プライマー中において前記配列(Ac')と前記配列(B')との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列(Ac')の塩基数をXとし、標的核酸配列中における前記配列(A)と前記配列(B)に挟まれた領域の塩基数をYとしたときに、 $(X - Y) / X$ が-1.00～1.00の範囲にあり、

プライマー中において前記配列(Ac')と前記配列(B')との間に介在配列が

存在する場合には、XおよびYを前記の通りとし、該介在配列の塩基数をY'としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$ が-1.00~1.00の範囲にあるプライマーを用意する工程、

(b) 鑄型核酸を用意する工程、

(c) 前記プライマーを前記鑄型核酸にアニーリングさせ、プライマー伸長反応を行なって前記標的核酸配列の相補配列を含む相補核酸を合成する工程、

(d) 工程(c)により合成された相補核酸の5'側に存在する配列(B')を同相補核酸上に存在する配列(Bc)にハイブリダイズさせ、これにより、鑄型核酸上の前記配列(A)の部分を一本鎖とする工程、および

(e) 工程(d)により一本鎖とされた鑄型核酸上の前記配列(A)の部分に、前記プライマーと同一の配列を有する他のプライマーをアニーリングさせて鎖置換反応を行なうことにより、工程(c)により合成された相補核酸を、前記他のプライマーにより新たに合成される相補核酸で置換する工程、

を含んでなる方法である。

また、本発明による核酸增幅法は、二本鎖からなる鑄型核酸中の標的核酸配列を増幅する方法であって、

(a) 二本鎖鑄型核酸の第一鎖における標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含んでなる第一のプライマーであって、

プライマー中において前記配列(Ac')と前記配列(B')との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列(Ac')の塩基数をXとし、標的核酸配列中における前記配列(A)と前記配列(B)に挟まれた領域の塩基数をYとしたときに、

$(X - Y) / X$ が-1.00~1.00の範囲にあり、

プライマー中において前記配列(Ac')と前記配列(B')との間に介在配列が存在する場合には、XおよびYを前記の通りとし、該介在配列の塩基数をY'としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$ が-1.00~1.00の範囲にあるプライマーを用意する工程、

(b) 二本鎖鑄型核酸の第二鎖における標的核酸配列の3'末端部分の配列(C)にハイブリダイズする配列(Cc')を3'末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列(C)よりも5'側に存在する配列(D)の相補配列(Dc)にハイブリダイズする配列(D')を前記配列(Cc')の5'側に含んでなる第二のプライマーであって、

プライマー中において前記配列(Cc')と前記配列(D')との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列(Cc')の塩基数をXとし、標的核酸配列中における前記配列(C)と前記配列(D)に挟まれた領域の塩基数をYとしたときに、
 $(X - Y) / X$ が-1.00～1.00の範囲にあり、

プライマー中において前記配列(Cc')と前記配列(D')との間に介在配列が存在する場合には、XおよびYを前記の通りとし、該介在配列の塩基数をY'としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$ が-1.00～1.00の範囲にあるプライマーを用意する工程、

(c) 第一の鑄型核酸および第二の鑄型核酸からなる二本鎖鑄型核酸を用意する工程；

(d) 前記第一および第二のプライマーをそれぞれ前記第一および第二の鑄型核酸にアニーリングさせ、それぞれプライマー伸長反応を行なって前記標的核酸配列の相補配列を含む第一および第二の相補核酸を合成する工程、

(e) 工程(d)により合成された第一および第二の相補核酸の5'側に存在する配列(B')および配列(D')を、同相補核酸上に存在する配列(Bc)および配列(Dc)にそれぞれハイブリダイズさせ、これにより、第一および第二の鑄型核酸上の前記配列(A)および配列(C)の部分を一本鎖とする工程、ならびに

(f) 工程(e)により一本鎖とされた第一および第二の鑄型核酸上の前記配列(A)および配列(C)の部分に、前記プライマーと同一の配列を有する他のプライマーをアニーリングさせて鎖置換反応を行なうことにより、工程(d)により合成された第一および第二の相補核酸を、前記他のプライマーにより新たに合成される相補核酸で置換する工程、

を含んでなる方法である。

さらに、本発明によるプライマーは、鑄型核酸中の標的核酸配列と相補的な核

酸を合成するためのプライマーであって、

標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含んでなり、標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含んでなり、

プライマー中において前記配列(Ac')と前記配列(B')との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列(Ac')の塩基数をXとし、標的核酸配列中における前記配列(A)と前記配列(B)に挟まれた領域の塩基数をYとしたときに、 $(X - Y) / X$ が-1.00~1.00の範囲にあり、

プライマー中において前記配列(Ac')と前記配列(B')との間に介在配列が存在する場合には、XおよびYを前記の通りとし、該介在配列の塩基数をY'としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$ が-1.00~1.00の範囲にあるプライマーである。

さらに、本発明によるプライマーセットは、二本鎖からなる鑄型核酸中の標的核酸配列を增幅するためのプライマーセットであって、

(a) 二本鎖鑄型核酸の第一鎖における標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含んでなる第一のプライマーであって、

プライマー中において前記配列(Ac')と前記配列(B')との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列(Ac')の塩基数をXとし、標的核酸配列中における前記配列(A)と前記配列(B)に挟まれた領域の塩基数をYとしたときに、 $(X - Y) / X$ が-1.00~1.00の範囲にあり、

プライマー中において前記配列(Ac')と前記配列(B')との間に介在配列が存在する場合には、XおよびYを前記の通りとし、該介在配列の塩基数をY'としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$ が-1.00~1.00の範囲にある、第一のプライマー、および

(b) 二本鎖鑄型核酸の第二鎖における標的核酸配列の3'末端部分の配列

(C) にハイブリダイズする配列 (Cc') を 3' 末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列 (C) よりも 5' 側に存在する配列 (D) の相補配列 (Dc) にハイブリダイズする配列 (D') を前記配列 (Cc') の 5' 側に含んでなる第二のプライマーであって、

プライマー中において前記配列 (Cc') と前記配列 (D') との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列 (Cc') の塩基数を X とし、標的核酸配列中における前記配列 (C) と前記配列 (D) に挟まれた領域の塩基数を Y としたときに、 $(X - Y) / X$ が $-1.00 \sim 1.00$ の範囲にあり、

プライマー中において前記配列 (Cc') と前記配列 (D') との間に介在配列が存在する場合には、X および Y を前記の通りとし、該介在配列の塩基数を Y' としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$ が $-1.00 \sim 1.00$ の範囲にある、第二のプライマー、

を含んでなるプライマーセットである。

本発明によれば、DNA または RNA を鑄型として、1 本のオリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより、等温条件下で連続して標的 DNA を合成することが可能となる。また、本発明によれば、DNA または RNA を鑄型として、1 対のオリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより、等温条件下で連続して標的 DNA を増幅することが可能となる。従って、本発明による方法は、サーマルサイクラー等の特別な装置を必要とせず、また、温度設定に要する時間も必要ないため、短時間で増幅産物が得られるという優れた効果を奏する。さらに、本発明に従って増幅された DNA 断片は、制限酵素処理することができるため、制限酵素断片長多型や変異検出等の遺伝子検査の領域において利用可能である。

[図面の簡単な説明]

図 1 は、本発明による核酸増幅方法を模式的に示した図である。

図 2 は、ヒト STS DYS237 遺伝子の増幅に用いたプライマーの 5' 側の配列と 3' 側の配列の、該遺伝子上での位置を示す図である。

図 3 は、sY160 遺伝子の増幅に用いたプライマーの 5' 側の配列と 3' 側の配列の、該遺伝子上での位置を示す図である。

図4は、M13mp18RT DNAの増幅に用いたプライマーの5'側の配列と3'側の配列の、該DNA上での位置を示す図である。

図5は、各種条件下におけるヒトSTS DYS237遺伝子の増幅の結果を示す図である。

図6は、各種条件下におけるヒトSTS DYS237遺伝子の増幅の結果を示す図である。

図7は、各種条件下におけるヒトSTS DYS237遺伝子の増幅の結果を示す図である。

図8は、各種条件下におけるsY160遺伝子の増幅の結果を示す図である。

図9は、各種条件下におけるM13mp18RT DNAの増幅の結果を示す図である。

図10は、各種条件下におけるM13mp18RT DNAの増幅の結果を示す図である。

図11は、ヒトSTS DYS237遺伝子からの増幅産物を制限酵素処理して得られる泳動パターンを示す図である。

図12は、sY160遺伝子からの増幅産物を制限酵素処理して得られる泳動パターンを示す図である。

図13は、M13mp18RT DNAからの増幅産物を制限酵素処理して得られる泳動パターンを示す図である。

図14は、各種融解温度調整剤の存在下におけるヒトSTS DYS237遺伝子の増幅の結果を示す図である。

[発明の具体的説明]

本発明による核酸合成の作用機序を、図1に模式的に示す。まず、鑄型となる核酸中の標的核酸配列を決定し、その標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)、および配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)を決定する。本発明によるプライマーは、配列(Ac')を含んでなり、さらにその5'側に配列(B')を含んでなる。配列(Ac')は、配列(A)にハイブリダイズするものである。配列(B')は、配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズするものである。ここで、

本発明によるプライマーは、前記配列（Ac'）と前記配列（B'）の間に、反応に影響を与えない介在配列を含んでいてもよい。このようなプライマーを鑄型核酸にアニーリングさせると、プライマー中の配列（Ac'）が標的核酸配列の配列（A）にハイブリダイズした状態となる（図1(a)）。この状態でプライマー伸長反応が起こると、標的核酸配列の相補配列を含む核酸が合成される。そして、合成された核酸の5'末端側に存在する配列（B'）が、同核酸中に存在する配列（Bc）にハイブリダイズし、これにより、合成された核酸の5'末端部分においてステムループ構造が形成される。その結果、鑄型核酸上の配列（A）が一本鎖となり、この部分に先のプライマーと同一の配列を有する他のプライマーがハイブリダイズする（図1(b)）。その後、鎖置換反応により、新たにハイブリダイズしたプライマーからの伸長反応が起こると同時に、先に合成された核酸が鑄型核酸から分離される（図1(c)）。

上記の作用機序において、配列（B'）が配列（Bc）にハイブリダイズする現象は、同一鎖上に相補領域が存在することにより起こる。一般に、二本鎖核酸が一本鎖に解離するときは、その末端あるいはそれ以外の比較的不安定な部分から部分的な解離が始まる。上記プライマーによる伸長反応で生成した二本鎖核酸は、比較的高温では末端部分の塩基対は解離と結合の平衡状態にあり、全体としては二本鎖を保っている。そのような状態で末端の解離した部分に相補的な配列が同一鎖上に存在すると、準安定な状態としてステムループ構造を形成することができる。このステムループ構造は安定的には存在しないが、その構造の形成により剥き出しとなった相補鎖部分（鑄型核酸上の配列（A））に同一のプライマーが結合し、すぐさまポリメラーゼが伸長反応を行うことにより、先に合成した鎖が置換されて遊離すると同時に、新たな二本鎖核酸が生成する。

以上の反応を繰り返すことにより、鑄型核酸中の標的核酸配列に相補的な核酸を大量に合成することが可能となる。また、上記の鑄型核酸の相補鎖を鑄型として同様の核酸合成を行なうこともできる。従って、本発明によれば、二本鎖の鑄型核酸中の標的核酸配列を増幅することも可能となる。

本発明による核酸合成法は、以下の工程を含んでなる：

(a) 標的核酸配列の3'末端部分の配列（A）にハイブリダイズする配列（Ac

') を 3' 末端部分に含んでなり、標的核酸配列において前記配列 (A) よりも 5' 側に存在する配列 (B) の相補配列 (Bc) にハイブリダイズする配列 (B') を前記配列 (Ac') の 5' 側に含んでなるプライマーであって、

プライマー中において前記配列 (Ac') と前記配列 (B') との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列 (Ac') の塩基数を X とし、標的核酸配列中における前記配列 (A) と前記配列 (B) に挟まれた領域の塩基数を Y としたときに、
 $(X - Y) / X$ が $-1.00 \sim 1.00$ の範囲にあり、

プライマー中において前記配列 (Ac') と前記配列 (B') との間に介在配列が存在する場合には、X および Y を前記の通りとし、該介在配列の塩基数を Y' としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$ が $-1.00 \sim 1.00$ の範囲にあるプライマーを用意する工程；

(b) 鑄型核酸を用意する工程；

(c) 前記プライマーを前記鑄型核酸にアニーリングさせ、プライマー伸長反応を行なって前記標的核酸配列の相補配列を含む相補核酸を合成する工程；

(d) 工程 (c) により合成された相補核酸の 5' 側に存在する配列 (B') を同相補核酸上に存在する配列 (Bc) にハイブリダイズさせ、これにより、鑄型核酸上の前記配列 (A) の部分を一本鎖とする工程；および

(e) 工程 (d) により一本鎖とされた鑄型核酸上の前記配列 (A) の部分に、前記プライマーと同一の配列を有する他のプライマーをアニーリングさせて鎖置換反応を行なうことにより、工程 (c) により合成された相補核酸を、前記他のプライマーにより新たに合成される相補核酸で置換する工程。

本発明において「ハイブリダイズする」とは、本発明によるプライマーの一部がストリンジエントな条件下で標的核酸にハイブリダイズし、標的核酸以外の核酸分子にはハイブリダイズしないことを意味する。ストリンジエントな条件は、本発明によるプライマーとその相補鎖との二重鎖の融解温度 Tm (°C) およびハイブリダイゼーション溶液の塩濃度などに依存して決定することができ、例えば、J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis; Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) 等を参照することができる。例えば、使用するプライマーの融解温度よりわずかに低い温度下でハイブリダイゼーション

を行なうと、プライマーを標的核酸に特異的にハイブリダイズさせることができる。このようなプライマーは、市販のプライマー構築ソフト、例えば、Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research社製)などを用いて設計することができる。本発明の好ましい実施態様によれば、ある標的核酸にハイブリダイズするプライマーは、その標的核酸に相補的な核酸分子の全部または一部の配列を含んでなるものである。

上記工程 (a) において用意される本発明によるプライマーは、工程 (c) における鑄型核酸へのアニーリング、工程 (d) における配列 (B') と配列 (Bc) とのハイブリダイゼーション、および同一配列を有する他のプライマーがアニーリングしうる一本鎖の配列 (A) の提供を可能とするように構成されている。以下、これらの工程を良好に行なうためのプライマーの構成について、さらに詳細に説明する。

上記工程 (e) において新たなプライマーが効率よくアニーリングするためには、工程 (c) により合成された相補核酸の工程 (d) におけるステムーループ構造形成により、鑄型核酸上の前記配列 (A) の部分を一本鎖とする必要がある。そのためには、配列 (Ac') の塩基数 X と標的核酸配列中における前記配列 (A) と前記配列 (B) に挟まれた領域の塩基数 Y との差 ($X - Y$) の、Xに対する割合 $(X - Y) / X$ が重要となる。ただし、鑄型核酸上において配列 (A) よりも 5' 側に存在する、プライマーのハイブリダイズとは関係無い部分まで一本鎖とする必要はない。また、上記工程 (e) において新たなプライマーが効率よくアニーリングするためには、工程 (c) により合成された相補核酸の工程 (d) におけるステムーループ構造形成を効率よく行なうことが必要となる。そして、効率の良いステムーループ構造形成、すなわち、効率の良い配列 (B') と配列 (Bc) とのハイブリダイゼーションには、前記配列 (B') と前記配列 (Bc) との間の距離 ($X + Y$) が重要となる。一般に、プライマー伸長反応のための最適温度は最高でも 72°C 付近であり、そのような低い温度では伸長鎖の長い領域にわたって解離することは困難である。従って、配列 (B') が配列 (Bc) に効率よくハイブリダイズするためには、両配列の間の塩基数は少ないほうが好ましいと考えられる。一方で、配列 (B') が配列 (Bc) にハイブリダイズして鑄型核酸上の前記

配列（A）の部分を一本鎖とするためには、配列（B'）と配列（Bc）との間の塩基数は多い方が好ましいと考えられる。

以上のような観点から、プライマーを構成する配列（Ac'）と配列（B'）の間に介在配列が存在しない場合において、本発明によるプライマーは、 $(X - Y) / X \geq -1.00$ 以上、好ましくは 0.00 以上、さらに好ましくは 0.05 以上、さらに好ましくは 0.10 以上となり、また、1.00 以下、好ましくは 0.75 以下、さらに好ましくは 0.50 以下、さらに好ましくは 0.25 以下となるように設計される。さらに、 $(X + Y)$ は、好ましくは 15 以上、さらに好ましくは 20 以上、さらに好ましくは 30 以上とされ、また、好ましくは 50 以下、さらに好ましくは 48 以下、さらに好ましくは 42 以下とされる。

また、プライマーを構成する配列（Ac'）と配列（B'）の間に介在配列（塩基数は Y' ）が存在する場合には、本発明によるプライマーは、 $\{X - (Y - Y')\} / X \geq -1.00$ 以上、好ましくは 0.00 以上、さらに好ましくは 0.05 以上、さらに好ましくは 0.10 以上となり、また、1.00 以下、好ましくは 0.75 以下、さらに好ましくは 0.50 以下、さらに好ましくは 0.25 以下となるように設計される。さらに、 $(X + Y + Y')$ は、好ましくは 15 以上、さらに好ましくは 20 以上、さらに好ましくは 30 以上とされ、また、好ましくは 100 以下、さらに好ましくは 75 以下、さらに好ましくは 50 以下とされる。

本発明によるプライマーは、デオキシヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチドにより構成されており、与えられた条件下で必要な特異性を維持しながら標的核酸との塩基対結合を行うことができる程度の鎖長を有するものである。本発明によるプライマーの鎖長は、好ましくは 15～100 ヌクレオチド、より好ましくは 30～60 ヌクレオチドとする。また、本発明によるプライマーを構成する配列（Ac'）と配列（B'）の長さは、それぞれ、好ましくは 5～50 ヌクレオチド、より好ましくは 10～30 ヌクレオチドである。また、必要に応じて、配列（Ac'）と配列（B'）の間に、反応に影響を与えない介在配列を挿入してもよい。

本発明において、「リボヌクレオチド」（単に「N」ということもある）とは、

リボヌクレオチド3'リン酸をいい、例えば、ATP, UTP, CTP, GTP等がある。さらに、リボヌクレオチドにはこれらの誘導体が含まれ、例えば、 α 位のリン酸基の酸素原子を硫黄原子に置き換えたリボヌクレオチド(α -チオーリボヌクレオチド)等がある。

また、本発明によるプライマーには、未修飾デオキシヌクレオチドおよび/または修飾デオキシヌクレオチドで構成されたオリゴヌクレオチドプライマー、および未修飾リボヌクレオチドおよび/または修飾リボヌクレオチドで構成されたオリゴヌクレオチドプライマー、未修飾デオキシヌクレオチドおよび/または修飾デオキシヌクレオチドおよび未修飾リボヌクレオチドおよび/または修飾リボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマー等も含まれる。

本発明によるプライマーは、オリゴヌクレオチドの合成に用いることのできる任意の方法、例えば、リン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホスホネート法等により合成できる。本発明によるプライマーは、例えば、ABI社(Applied Biosystem Inc.)のDNAシンセサイザー394型を用いてホスホアミダイト法により合成すれば、容易に取得することができる。

本発明による核酸合成方法において使用するDNAポリメラーゼは、鎖置換(strand displacement)活性(鎖置換能)を有するものであればよく、常温性、中温性、もしくは耐熱性のいずれのものも好適に使用できる。また、このDNAポリメラーゼは、天然体もしくは人工的に変異を加えた変異体のいずれであってもよい。さらに、このDNAポリメラーゼは、実質的に5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を有しないものであることが好ましい。このようなDNAポリメラーゼとしては、バチルス・ステアロサーモフィルス(Bacillus stearothermophilus、以下「B. s t」という)、バチルス・カルドテナックス(Bacillus caldotenax、以下「B. c a」という)等の好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼの5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠失した変異体、大腸菌(E. coli)由来DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント等が挙げられる。本発明による核酸合成方法において使用するDNAポリメラーゼとしては、さらに、Vent DNAポリメラーゼ、Vent(Exo-)DNAポリメラーゼ、DeepVent DNAポリメラーゼ、DeepVent(Exo-)DNAポリメラーゼ、Φ29ファージDNAポリメラーゼ、

M S - 2 ファージDNAポリメラーゼ、Z-Taq DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼ、Pfu turbo DNAポリメラーゼ、KOD DNAポリメラーゼ、9° Nm DNAポリメラーゼ、Therminater DNAポリメラーゼ等が挙げられる。

本発明による核酸合成方法において使用するその他の試薬としては、例えば、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウム、硫酸マグネシウム等の触媒、d N T P ミックス等の基質、トリス塩酸バッファー、トライシンバッファー、リン酸ナトリウムバッファー、リン酸カリウムバッファー等の緩衝液を使用することができる。さらに、ジメチルスルホキシド(dimethyl sulfoxide)やベタイン(N,N,N-trimethylglycine)等の添加物、国際公開第99/54455号パンフレットに記載の酸性物質、陽イオン錯体等を使用してもよい。

本発明による核酸合成方法において鑄型となる核酸は、DNAまたはRNAのどちらでもよい。これらの核酸は、例えば、血液、組織、細胞、さらには動物、植物のような生体由来試料、または食品、土壤、排水等から分離された微生物由来試料から単離することができる。

鑄型核酸の単離は任意の方法で行うことができ、例えば、界面活性剤による溶解処理、音波処理、ガラスピーブを用いた振盪攪拌およびフレンチプレス等を用いる方法が挙げられる。また、内在性ヌクレアーゼが存在する場合には、単離された核酸を精製することが好ましい。核酸の精製は、例えば、フェノール抽出、クロマトグラフィー、イオン交換、ゲル電気泳動、密度に依存した遠心分離などにより実施することが可能である。

より具体的には、本発明による核酸合成方法における鑄型核酸としては、上記方法により単離したゲノムDNAやPCRフラグメントのような二本鎖核酸、全RNAもしくはmRNAから逆転写反応で調製されたcDNAのような一本鎖核酸のいずれも使用可能である。上記二本鎖核酸の場合は、変性工程(denaturing)を行なって一本鎖とすることにより、より最適に利用することができる。

上記の逆転写反応に用いられる酵素は、RNAを鑄型としたcDNA合成活性を有するものであれば特に限定されず、例えば、トリ骨髄芽球症ウイルス由来逆転写酵素(AMV RTase)、ラウス関連ウイルス2逆転写酵素(RAV-2 RTase)、モロニーネズミ白血病ウイルス由来逆転写酵素(MMLV R

Tase) 等、種々の起源の逆転写酵素が挙げられる。このほか、逆転写活性を併せ持つDNAポリメラーゼを使用することも可能である。また、本発明の目的のためには、高温で逆転写活性を有する酵素が最適であり、例えばサーマス属細菌由来DNAポリメラーゼ(Tth DNAポリメラーゼ等)、バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼ等を使用できる。特に好ましい酵素を例示すれば、例えば、好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼとして、B. st 由来DNAポリメラーゼ(Bst DNAポリメラーゼ)、およびB. ca 由来DNAポリメラーゼ(Bca DNAポリメラーゼ)、例えばBcaBEST DNAポリメラーゼ、Bca(exo-)DNAポリメラーゼ等が挙げられる。例えば、Bca DNAポリメラーゼは、反応にマンガンイオンを必要とせず、高温条件下で鑄型RNAの二次構造形成を抑制しながら cDNAを合成することが可能である。

さらに、本発明による核酸合成方法においては、逆転写活性を併せ持つDNAポリメラーゼ、例えば、BcaBEST DNAポリメラーゼ、Bca(exo-)DNAポリメラーゼ等を使うことにより、全RNAもしくはmRNAからの逆転写反応とcDNAを鑄型にしたDNAポリメラーゼ反応を1種類のポリメラーゼで行なうことが可能である。また、DNAポリメラーゼと、MMLV逆転写酵素などの逆転写酵素とを組み合わせて用いてもよい。

本発明による核酸合成方法では、鑄型核酸が二本鎖核酸の場合でも、これをそのまま反応に用いることができるが、必要に応じてそれらを変性して一本鎖にすることにより、鑄型核酸へのプライマーのアニーリングを効率よく行なうこともできる。温度を約95°Cに上昇させることは、好ましい核酸変性法である。他の方法として、pHを上昇させることにより変性させることも可能であるが、この場合には、プライマーを標的核酸にハイブリダイズさせるためにpHを低下させる必要がある。

本発明の好ましい実施態様によれば、工程(e)により得られた二本鎖の核酸は工程(d)で繰り返して使用される。すなわち、工程(e)により得られた二本鎖の核酸は工程(c)により得られるものと同一の構造を有するため、そのまま工程(d)において利用される。これにより、鑄型核酸中の標的核酸配列と相補的な核酸を量産することができる。

本発明による核酸合成方法の特徴の一つは、等温で実施可能であることである。従って、本発明によれば、鑄型核酸中の標的核酸配列と相補的な核酸を合成する方法であって、鑄型核酸と本発明によるプライマーとを含んでなる核酸合成用溶液を用意する工程、およびこの核酸合成用溶液を等温でインキュベートする工程を含んでなる方法が提供される。ここで、「等温」とは、酵素およびプライマーが実質的に機能しうるような、ほぼ一定の温度条件下に保つことをいう。

本発明による核酸合成方法は、使用する酵素の活性を維持できる温度に保つことにより実施することができる。また、本発明による核酸合成方法において、プライマーが標的核酸にアニーリングするためには、例えば、反応温度を、そのプライマーの融解温度 (T_m) 付近の温度、もしくはそれ以下に設定することが好ましく、さらには、プライマーの融解温度 (T_m) を考慮し、ストリンジエンシーのレベルを設定することが好ましい。従って、この温度は、好ましくは、約20°C～約75°Cであり、さらに好ましくは、約35°C～約65°Cとする。

本発明による核酸合成方法において、二本鎖からなる核酸を鑄型とし、その各鎖に対して設計した2種の本発明によるプライマーからなるプライマーセットを用いることにより、前記核酸中の標的核酸配列を增幅することができる。従って、本発明によれば、二本鎖からなる鑄型核酸中の標的核酸配列を増幅する方法が提供され、この核酸増幅方法は以下の工程を含んでなる：

(a) 二本鎖鑄型核酸の第一鎖における標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含んでなる第一のプライマーであって、

プライマー中において前記配列(Ac')と前記配列(B')との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列(Ac')の塩基数をXとし、標的核酸配列中における前記配列(A)と前記配列(B)に挟まれた領域の塩基数をYとしたときに、 $(X - Y) / X$ が-1.00～1.00の範囲にあり、

プライマー中において前記配列(Ac')と前記配列(B')との間に介在配列が存在する場合には、XおよびYを前記の通りとし、該介在配列の塩基数をY' と

したときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$ が $-1.00 \sim 1.00$ の範囲にあるプライマーを用意する工程；

(b) 二本鎖鑄型核酸の第二鎖における標的核酸配列の 3' 末端部分の配列 (C) にハイブリダイズする配列 (Cc') を 3' 末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列 (C) よりも 5' 側に存在する配列 (D) の相補配列 (Dc) にハイブリダイズする配列 (D') を前記配列 (Cc') の 5' 側に含んでなる第二のプライマーであって、

プライマー中において前記配列 (Cc') と前記配列 (D') との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列 (Cc') の塩基数を X とし、標的核酸配列中における前記配列 (C) と前記配列 (D) に挟まれた領域の塩基数を Y としたときに、 $(X - Y) / X$ が $-1.00 \sim 1.00$ の範囲にあり、

プライマー中において前記配列 (Cc') と前記配列 (D') との間に介在配列が存在する場合には、X および Y を前記の通りとし、該介在配列の塩基数を Y' としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$ が $-1.00 \sim 1.00$ の範囲にあるプライマーを用意する工程；

(c) 第一の鑄型核酸および第二の鑄型核酸からなる二本鎖鑄型核酸を用意する工程；

(d) 前記第一および第二のプライマーをそれぞれ前記第一および第二の鑄型核酸にアニーリングさせ、それぞれプライマー伸長反応を行なって前記標的核酸配列の相補配列を含む第一および第二の相補核酸を合成する工程；

(e) 工程 (d) により合成された第一および第二の相補核酸の 5' 側に存在する配列 (B') および配列 (D') を、同相補核酸上に存在する配列 (Bc) および配列 (Dc) にそれぞれハイブリダイズさせ、これにより、第一および第二の鑄型核酸上の前記配列 (A) および配列 (C) の部分を一本鎖とする工程；ならびに

(f) 工程 (e) により一本鎖とされた第一および第二の鑄型核酸上の前記配列 (A) および配列 (C) の部分に、前記プライマーと同一の配列を有する他のプライマーをアニーリングさせて鎖置換反応を行なうことにより、工程 (d) により合成された第一および第二の相補核酸を、前記他のプライマーにより新たに合成される相補核酸で置換する工程。

なお、プライマーの設計、反応条件等の詳細は、本発明による核酸合成方法について上記した通りである。

本発明の好ましい実施態様によれば、本発明による核酸増幅方法において、工程（f）により得られた二本鎖の核酸は工程（e）で繰り返して使用される。すなわち、工程（f）により得られた二本鎖の核酸は工程（d）により得られるものと同一の構造を有するため、そのまま工程（e）において利用される。

他の好ましい実施態様によれば、本発明による核酸増幅方法において、工程（f）により一本鎖の核酸として得られた第一および第二の相補核酸は、工程（d）においてそれぞれ第二および第一の鑄型核酸として繰り返して使用される。すなわち、工程（f）により得られた第一の相補核酸は工程（d）における第二の鑄型核酸として利用され、工程（f）により得られた第二の相補核酸は工程（d）における第一の鑄型核酸として利用される。

本発明による核酸増幅方法は、本発明による核酸合成方法と同様に等温で実施可能である。従って、本発明によれば、二本鎖からなる鑄型核酸中の標的核酸配列を増幅する方法であって、二本鎖鑄型核酸と本発明によるプライマーセットとを含んでなる核酸増幅用溶液を用意する工程、およびこの核酸増幅用溶液を等温でインキュベートする工程を含んでなる方法が提供される。ここで、「等温」とは、酵素およびプライマーが実質的に機能しうるような、ほぼ一定の温度条件下に保つことをいう。その温度条件の詳細については、本発明による核酸合成方法に関して上述したとおりである。

本発明による核酸増幅方法においては、逆転写酵素活性を持つDNAポリメラーゼ、例えば、B c a B E S T DNAポリメラーゼを使用すると、RNAを鑄型とする場合においても、該RNAからcDNAを調製する工程を含む核酸増幅方法として最適に実施できる。また、RNAからcDNAを調製する工程を独立させて行い、その生成物を本発明による核酸増幅方法に使用してもよい。

本発明による核酸合成方法および核酸増幅方法において、核酸の合成効率または増幅効率を高めるために、融解温度調整剤を反応溶液中に添加することができる。核酸の融解温度（T_m）は、一般的に、核酸中の二本鎖形成部分の具体的なヌクレオチド配列によって決定される。反応溶液中に融解温度調整剤を添加するこ

とにより、この融解温度を変化させることができ、従って、一定の温度下では、核酸における二本鎖形成の強度を調整することが可能となる。一般的な融解温度調整剤は、融解温度を下げる効果を有する。このような融解温度調整剤を添加することにより、2本の核酸の間の二本鎖形成部分の融解温度を下げることができ、換言すれば、その二本鎖形成の強度を下げることが可能となる。従って、本発明による核酸合成方法および核酸增幅方法においてこのような融解温度調整剤を反応溶液中に添加すると、強固な二本鎖を形成するG Cの豊富な核酸領域や複雑な二次構造を形成する領域において効率的に二本鎖部分を一本鎖とすることが可能となり、これにより、プライマーによる伸長反応が終わった後に次のプライマーが目的領域にハイブリダイズしやすくなるため、核酸の合成効率および増幅効率を上げることができる。本発明において用いられる融解温度調整剤およびその反応溶液中の濃度は、ハイブリダイゼーション条件に影響を与える他の反応条件、例えば塩濃度、反応温度等を考慮して、当業者により適切に選択される。従って、融解温度調整剤は、特に制限されるものではないが、好ましくはジメチルスルホキシド(DMSO)、ベタイン、ホルムアミドもしくはグリセロール、またはこれらの任意の組み合わせとされ、より好ましくはジメチルスルホキシド(DMSO)とされる。

さらに、本発明による核酸合成方法および核酸增幅方法において、酵素安定化剤を反応溶液中に添加することもできる。これにより、反応液中の酵素が安定化されるため、核酸の合成効率および増幅効率を高めることが可能となる。本発明において用いられる酵素安定化剤は、グリセロールなどの、当技術分野において知られているいかなるものであってもよく、特に制限されない。

さらに、本発明による核酸合成方法および核酸增幅方法において、DNAポリメラーゼ、逆転写酵素などの酵素の耐熱性を増強するための試薬を反応溶液中に添加することもできる。これにより、反応液中の酵素が安定化されるため、核酸の合成効率および増幅効率を高めることができが可能となる。このような試薬は、トレハロースなどの、当技術分野において知られているいかなるものであってもよく、特に制限されない。

本発明による核酸合成方法および核酸增幅方法においては、酵素が失活するか、

またはプライマーをはじめとする試薬のうちの一つが使い尽くされるかのいずれかまで合成反応または増幅反応が繰り返される。

本発明による核酸合成方法および核酸増幅方法においては、非天然ヌクレオチドを含む核酸を錆型核酸とすることも可能である。本明細書において「非天然ヌクレオチド」とは、天然ヌクレオチドに含まれる塩基（アデニン、グアニン、シトシン、およびチミンもしくはウラシル）以外の塩基を含むヌクレオチドであつて、核酸配列中に取り込まれうるものを使い、例えば、キサントシン類、ジアミノピリミジン類、isoG, isoC (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6329-6333, 1995) 等が挙げられる。非天然ヌクレオチドを含む標的核酸の増幅には、一般に、耐熱性を持たない核酸増幅酵素が用いられる。一方で、本発明による核酸合成方法および核酸増幅方法は、例えば 50 °C 前後の等温で行うことが可能であるため、従来の PCR 法と比較して核酸増幅酵素 (DNA ポリメラーゼなど) が失活する可能性が低い。従って、本発明による核酸合成方法および核酸増幅方法は、耐熱性を持たない核酸増幅酵素が用いられる非天然ヌクレオチドを含む標的核酸の増幅にも有効である。非天然ヌクレオチドを含む核酸の増幅に用いられる酵素は、そのような標的核酸を増幅可能なものであればよく、特に限定されないが、特に取り込み効率の観点から、Y188L/E478Q 変異型 HIV I 逆転写酵素、AMV 逆転写酵素、DNA ポリメラーゼのクレノウ断片、9°N DNA ポリメラーゼ、HotTub DNA ポリメラーゼ等が好適である (Michael Sismour 1 et al., Biochemistry 42, No.28, 8598, 2003 / 米国特許第 6617106 号明細書、Michael J. Lutz et al., Bioorganic & Medical Chemistry letters 8, 1149-1152, 1998 等を参照のこと)。さらに、核酸増幅酵素の耐熱性を向上させる物質、例えばトレハロースなど、を反応溶液に添加することもでき、これにより、より効率的に非天然ヌクレオチドを含む標的核酸の増幅を行うことができる。

本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法を使用することにより、DNA チップに固定するための一本鎖核酸、塩基配列決定のための一本鎖 DNA プローブ、または長鎖 PCR 法のためのメガプライマーを、簡便かつ迅速に作製することができる。例えば、本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法を使用することにより、目的に応じて、センス配列のみ、あるいはアンチセンス配列のみを

選択して増幅させることが可能である。従って、本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法は、ある標的核酸のセンス配列またはアンチセンス配列の製造方法としても有用である。

本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法によって得られた増幅産物の存在は、多くのあらゆる方法により検出が可能である。一つの方法は、一般的なゲル電気泳動による特定のサイズの増幅産物の検出である。この方法では、例えば、エチジウムプロマイドやサイバーグリーン等の蛍光物質により検出できる。他の方法としては、ビオチンのような標識を有する標識プローブを用い、これを増幅産物にハイブリダイズさせることにより検出することもできる。ビオチンは、蛍光標識されたアビシン、ペルオキシダーゼのような酵素に結合したアビシン等との結合により検出可能である。

また、本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法によって得られた増幅産物は、免疫クロマトグラフなどを用いても検出が可能である。この方法では、肉眼で検出可能な標識を利用したクロマトグラフ媒体を用いることが考案されている（イムノクロマトグラフィー法）。上記増幅断片と標識プローブとをハイブリダイズさせ、該増幅断片のさらに異なる配列とハイブリダイズ可能な捕捉用プローブをクロマト媒体に固定しておけば、その固定した部分でトラップすることができ、クロマト媒体での検出が可能となる。その結果、肉眼的にシンプルな検出が可能となる。

さらに、本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法において、ビーズに固定化したプライマーを用いることができ、これにより、核酸合成または核酸増幅によるビーズの凝集を確認することによって合成産物または増幅産物を検出することが可能となる。また、複数の標的核酸を合成または増幅の対象とする場合には、それぞれの標的核酸について設計したプライマーを相互に識別可能なビーズ（例えば、色、形状等が異なるビーズ）に固定化し、これらを含有する单一の反応溶液を用いて核酸合成反応または核酸増幅反応を行なうことができる。その場合には、各ビーズの凝集の有無を確認することにより、各標的核酸の存否を知ることができる。

さらに、本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法において、アレイ（例

えば、DNAチップ)に固定化したプライマーを用いることができ、これにより、核酸合成または核酸増幅によってアレイ上に生ずる核酸凝集物を確認することにより、合成産物または増幅産物を検出することが可能となる。また、複数の標的核酸を合成または増幅の対象とする場合には、それぞれの標的核酸について設計したプライマーをアレイ上の識別可能な位置に固定化し、該アレイを含有する反応溶液を用いて核酸合成反応または核酸増幅反応を行なうことができる。その場合には、アレイ上の対応する位置における核酸凝集物の有無を確認することにより、各標的核酸の存否を知ることができる。核酸凝集物の確認に代えて、インターラーカーーターを利用することもできる。

本発明による核酸増幅方法によって得られた増幅断片は通常の塩基により構成されるため、増幅後、増幅断片内部の制限酵素部位を用いて適当なベクターにサブクローニングすることも可能である。さらに、RFLPのような、制限酵素を用いた処理をすることも可能であり、遺伝子検査の分野においても広く利用することができる。また、本発明による核酸増幅方法によって得られた増幅断片は通常の塩基により構成されるため、増幅断片中にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を組込んでおけば、増幅断片から直接RNAを合成することが可能となり、このRNAは、RNAプローブとして使用することもできる。

さらに、本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法においては、通常のdNTPの代わりに、ビオチンや蛍光物質で標識された塩基を使用することができ、これにより、ビオチンや蛍光物質で標識されたDNAプローブを調製することも可能である。

本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法により調製された一本鎖核酸は、DNAチップ上に固定するDNA断片として使用できる。すなわち、本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法は、DNAチップ作製において固定化するDNA鎖を調製する方法にも応用が可能である。また、あらかじめ、プライマーの5'末端をあらかじめDNAチップ上に固定しておき、そのチップ上で核酸合成または核酸増幅を行ない、DNAチップを作製することも可能である。また、その核酸合成または核酸増幅を行なう前にあらかじめ蛍光標識プローブを添加しておけば、DNAチップ上で核酸合成または核酸増幅を行ないながら、リアルタイ

ムな検出も可能となる。

本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法を実施するために、必要な試薬をまとめてキットとすることができます。従って、本発明によるキットは、本発明によるプライマーまたは本発明によるプライマーセットを含んでなる。また、本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法は、本発明によるプライマーまたはプライマーセット以外のプライマーを必要としないという利点を有する。従って、本発明の好ましい実施態様によれば、本発明によるキットは、本発明によるプライマーまたは本発明によるプライマーセット以外のプライマー成分を含まないものとされる。本発明によるキットはさらに、上述の試薬類、反応容器、説明書等を含んでいてもよい。

[実 施 例]

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

例1

本例では、鑄型としてHuman DNA (Clontech社製) を使用してヒト S T S D Y S 2 3 7 遺伝子の増幅を試みた。用いたプライマーは、以下に示す通りとした。これらのプライマーの合成は、エスペックオリゴサービス株式会社に依頼した。

実験に使用したプライマーの特徴を以下に記載した。また、テンプレートに対する各プライマー領域の位置関係は図2に示す通りとした。なお、下記の配列において、下線部は、センスプライマーおよびアンチセンスプライマーのそれぞれにおいて共通の3'末端領域を示す。

プライマーセット1：鑄型にアニーリングする配列（20mer）のみからなるプライマーの組み合わせ；

SY153L：GCATCCTCATTTATGTCCA（配列番号1）：

SY153R：CAACCCAAAAGCACTGAGTA（配列番号2）。

プライマーセット2：各プライマーの3'端側にある配列（20mer：プライマーセット1と同様の配列）が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端

側にある配列（13mer）が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの3'末端残基の1塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ；

SY153LP13-0 : AAGTCTCTGATGTGATCCTCATTATGTCCA (配列番号3) :

SY153RP13-0 : AGAACTCGCTTACAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号4)。

プライマーセット3：各プライマーの3'端側にある配列（20mer：プライマーセット1と同様の配列）が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列（13mer）が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの3'末端残基の6塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ；

SY153LP13-5 : GTATTAAGTCTTGCATCCTCATTATGTCCA (配列番号5) :

SY153RP13-5 : CACTAAGAACTCGCAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号6)。

プライマーセット4：各プライマーの3'端側にある配列（20mer：プライマーセット1と同様の配列）が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列（13mer）が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの3'末端残基の11塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ；

SY153LP13-10 : GTTCAGTATTAAGGGCATCCTCATTATGTCCA (配列番号7) :

SY153RP13-10 : AGCATCATAAGACACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号8)。

プライマーセット5：各プライマーの3'端側にある配列（20mer：プライマーセット1と同様の配列）が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列（13mer）が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの3'末端残基の16塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ；

SY153LP13-15 : CATTGTCAGTAGCATCCTCATTATGTCCA (配列番号9) :

SY153RP13-15 : CTTGCAGCATCACCAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号10)。

プライマーセット6：各プライマーの3'端側にある配列（20mer：プライマーセット1と同様の配列）が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列（10mer）が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマ

ーの 3' 末端残基の 21 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ；

SY153LP10 : GGCATTGTTGCATCCTCATTTCATGTCCA (配列番号 11) :

SY153RP10 : ATCTTGCAGCCAAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号 12)。

プライマーセット 7：各プライマーの 3' 端側にある配列 (20mer : プライマーセット 1 と同様の配列) が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (13mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの 3' 末端残基の 21 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ；

SY153LP13 : TGTGGCATTGTTGCATCCTCATTTCATGTCCA (配列番号 13) :

SY153RP13 : AACATCTTGCAGCCAAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号 14)。

プライマーセット 8：各プライマーの 3' 端側にある配列 (20mer : プライマーセット 1 と同様の配列) が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (16mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの 3' 末端残基の 21 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ；

SY153LP16 : TTATGTGGCATTGTTGCATCCTCATTTCATGTCCA (配列番号 15) :

SY153RP16 : CTTAACATCTTGCAGCCAAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号 16)。

プライマーセット 9：各プライマーの 3' 端側にある配列 (20mer : プライマーセット 1 と同様の配列) が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (22mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの 3' 末端残基の 21 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ；

SY153LP22 : TTACCTTATGTGGCATTGTTGCATCCTCATTTCATGTCCA (配列番号 17) :

SY153RP22 : ATTTAACATCTTGCAGCCAAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号 18)。

プライマーセット 10：各プライマーの 3' 端側にある配列 (20mer : プライマーセット 1 と同様の配列) が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (25mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの 3' 末端残基の 21 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするような

プライマーの組み合わせ；

SY153LP25 : TCATTACCTTATGTGGCATTGTTGCATCCTCATTTATGTCCA (配列番号 19)

：

SY153RP25 : AAGATTAACTAACATCTTGCAGCCAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号 20)。

プライマーセット 11：各プライマーの 3' 端側にある配列 (20mer: プライマーセット 1 と同様の配列) が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (28mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの 3' 末端残基の 21 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ；

SY153LP28 : CAGTCATTACCTTATGTGGCATTGTTGCATCCTCATTTATGTCCA (配列番号 21) :

SY153RP28 : AAGAAGATTAACTAACATCTTGCAGCCAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号 22)。

次の組成を有する反応液 (25 μL) : Tris-HCl (20 mM, pH 8.8)、KCl (10 mM)、(NH₄)₂SO₄ (10 mM)、MgSO₄ (2 mM)、Triton X-100 (0.1%)、dNTP (0.4 mM)、それ 100 pmol の上記のプライマー対および 100 ng の鑄型DNA、さらに 8 U の Bst DNA ポリメラーゼ (NEW ENGLAND Biolabs) を含有；を調製し、これを 60°C で 20、40、または 60 分間インキュベートした。

各反応液 5 μL について、3% NuSieve GTG Agarose (BioWhittaker Molecular Applications (BMA)社製；タカラバイオ社より購入；「NuSieve」は BMA 社の登録商標である) にて電気泳動を行った。結果は図 5、図 6、および図 7 に示すおりである。これらの図における各レーンのサンプルは下記の表 1～3 に示す通りである。

表1：図5の電気泳動写真における泳動レーンの説明

| レーン | プライマー | テンプレート | 反応時間（分） |
|-----|--------------------------------|--------|---------|
| 1 | DNA size marker (20 bp ladder) | | |
| 2 | プライマーセット1 | 有 | 20 |
| 3 | プライマーセット1 | 有 | 40 |
| 4 | プライマーセット1 | 有 | 60 |
| 5 | プライマーセット1 | 無 | 60 |
| 6 | プライマーセット2 | 有 | 20 |
| 7 | プライマーセット2 | 有 | 40 |
| 8 | プライマーセット2 | 有 | 60 |
| 9 | プライマーセット2 | 無 | 60 |
| 10 | プライマーセット3 | 有 | 20 |
| 11 | プライマーセット3 | 有 | 40 |
| 12 | プライマーセット3 | 有 | 60 |
| 13 | プライマーセット3 | 無 | 60 |
| 14 | プライマーセット4 | 有 | 20 |
| 15 | プライマーセット4 | 有 | 40 |
| 16 | プライマーセット4 | 有 | 60 |
| 17 | プライマーセット4 | 無 | 60 |
| 18 | プライマーセット5 | 有 | 20 |
| 19 | プライマーセット5 | 有 | 40 |
| 20 | プライマーセット5 | 有 | 60 |
| 21 | プライマーセット5 | 無 | 60 |

表2：図6の電気泳動写真における泳動レーンの説明

| レーン | プライマー | テンプレート | 反応時間（分） |
|-----|--------------------------------|--------|---------|
| 1 | DNA size marker (20 bp ladder) | | |
| 2 | プライマーセット6 | 有 | 20 |
| 3 | プライマーセット6 | 有 | 40 |
| 4 | プライマーセット6 | 有 | 60 |
| 5 | プライマーセット6 | 無 | 60 |
| 6 | プライマーセット7 | 有 | 20 |
| 7 | プライマーセット7 | 有 | 40 |
| 8 | プライマーセット7 | 有 | 60 |
| 9 | プライマーセット7 | 無 | 60 |
| 10 | プライマーセット8 | 有 | 20 |
| 11 | プライマーセット8 | 有 | 40 |
| 12 | プライマーセット8 | 有 | 60 |
| 13 | プライマーセット8 | 無 | 60 |
| 14 | プライマーセット9 | 有 | 20 |
| 15 | プライマーセット9 | 有 | 40 |
| 16 | プライマーセット9 | 有 | 60 |
| 17 | プライマーセット9 | 無 | 60 |
| 18 | プライマーセット10 | 有 | 20 |
| 19 | プライマーセット10 | 有 | 40 |
| 20 | プライマーセット10 | 有 | 60 |
| 21 | プライマーセット10 | 無 | 60 |

表3：図7の電気泳動写真における泳動レーンの説明

| レーン | プライマー | テンプレート | 反応時間（分） |
|-----|--------------------------------|--------|---------|
| 1 | DNA size marker (20 bp ladder) | | |
| 2 | プライマーセット1 1 | 有 | 20 |
| 3 | プライマーセット1 1 | 有 | 40 |
| 4 | プライマーセット1 1 | 有 | 60 |
| 5 | プライマーセット1 1 | 無 | 60 |

各図のレーン5、9、13、17、および21ではテンプレートが添加されていないため、未反応のプライマーが染色されたもの以外のバンドは確認されなかつた。

図5のレーン2および3ではテンプレートが添加されているため、未反応のプライマーと高分子サイズのテンプレートのバンドが確認された。しかし、反応時間が不十分であるため、増幅産物は確認されなかつた。図5のレーン4からわかるように、テンプレートが添加された反応時間60分のサンプルについては増幅産物が得られたが、これらは、低サイズ域がラダー状で高サイズ域がスメアー状の増幅産物であった。図5のレーン2～5では、鑄型にアニーリングするオリゴヌクレオチド(20mer)のみからなるプライマーセット1を用いており、本発明による合成反応が起らなかつたために、目的とする増幅産物が得られなかつた。

図5のレーン6以降は各プライマーの3'端側にある配列(20mer:プライマーセット1と同様の配列)が鑄型にアニーリングし、5'端側にある配列が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの3'末端残基の下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーセットを用いて増幅を行つた結果である。

図5のレーン8および12からわかるように、プライマーセット2または3を用いた場合、60分の反応時間で目的増幅産物を得ることが可能であった。低ササイズのバンドのうち、約160bp付近のバンドは、本発明の合成反応により予

想される産物である。

さらに、図5のレーン15および16、図6のレーン3、4、7、8、11、12、15、16、19および20、ならびに図7のレーン3および4からわかるように、プライマーセット4、6、7、8、9、10、および11を用いた場合、40分以上の反応時間で目的増幅産物を得ることが可能であった。低サイズのバンドのうち、約160 bp付近のバンドは、本発明の合成反応により予想される産物である。

さらに、図5のレーン18～20からわかるように、プライマーセット5を用いた場合、20分以上の反応時間で目的増幅産物を得ることが可能であった。低サイズのバンドのうち、約160 bp付近のバンドは、本発明の合成反応により予想される産物である。

プライマーセット2および3のように、そのプライマー伸長鎖上における、プライマーの3'末端側配列に相当する領域と5'末端側配列がハイブリダイズする領域との間隔が比較的小さい場合には、同一の配列を有する次のプライマーがアニーリングすべき鑄型上の配列の大部分が二本鎖のままとなり、次のプライマーのアニーリングが困難になるために、長い反応時間が必要になると考えられる。

また、プライマーセット6～11のように、そのプライマー伸長鎖上における、プライマーの3'末端側配列に相当する領域と5'末端側配列がハイブリダイズする領域との間隔が比較的大きい場合には、各プライマーの5'端側の配列が折り返す効率が低下し、比較的長い反応時間が必要になると考えられる。

一方で、プライマーセット5のように、そのプライマー伸長鎖上における、プライマーの3'末端側配列に相当する領域と5'末端側配列がハイブリダイズする領域との間隔が小さすぎず、かつ、大きすぎない距離にある時に、本発明における最も効率のよい増幅が可能となると考えられる。

例2

本例では、鑄型としてHuman DNA (Clontech社製) を使用してsY160遺伝子の増幅を試みた。用いたプライマーは、以下に示す通りとした。これらのプライマーの合成は、エスペックオリゴサービス株式会社に依頼した。

実験に使用したプライマーの特徴を以下に記載した。また、テンプレートに対する各プライマー領域の位置関係は図3に示す通りとした。なお、下記の配列において、下線部は、センスプライマーおよびアンチセンスプライマーのそれぞれにおいて共通の3'末端領域を示す。

プライマーセット12：プライマーの3'端側にある配列(20mer)が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(13mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の27塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと：プライマーの3'端側にある配列(20mer)が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(13mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の21塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーの組み合わせ；

SY160LP13 : ATT CGATTCCGTTTACGGGTCTCGAATGGAATA (配列番号23) :

SY160RP13 : CTAAATCGAATGGTCATTGCATTCCCTTCCATT (配列番号24)。

プライマーセット13：プライマーの3'端側にある配列(20mer:プライマーセット12と同様の配列)が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(16mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の27塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと：プライマーの3'端側にある配列(20mer:プライマーセット12と同様の配列)が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(16mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の21塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーの組み合わせ；

SY160LP16 : GACATTCGATTCCGTTACGGGTCTCGAATGGAATA (配列番号25) :

SY160RP16 : GAACTAAATCGAATGGTCAATTGCATTCCCTTCCATT (配列番号26)。

次の組成を有する反応液(25μL) : Tris-HCl(20mM, pH8.8)、KCl(10mM)、(NH₄)₂SO₄(10mM)、MgSO₄(2mM)、Triton X-100(0.1%)、dNTP(0.4mM)、それぞれ100pmolの上記のプライマー対および100ngの鑄型DNA、さら

に 8 U の Bst DNA ポリメラーゼ (NEW ENGLAND Bi oLab s) を含有 ; を調製し、これを 60 °C で 60 または 90 分間インキュベートした。

各反応液 5 μl について、3 % NuSieve GTG Agarose (BMA 社製；タカラバイオ社より購入；「NuSieve」は BMA 社の登録商標である) にて電気泳動を行った。結果は図 8 に示すとおりである。これらの図における各レーンのサンプルは下記の表 4 に示す通りである。

表 4 : 図 8 の電気泳動写真における泳動レーンの説明

| レーン | プライマー | テンプレート | 反応時間 (分) |
|-----|--------------------------------|--------|----------|
| 1 | DNA size marker (20 bp ladder) | | |
| 2 | プライマーセット 1 2 | 有 | 60 |
| 3 | プライマーセット 1 2 | 有 | 90 |
| 4 | プライマーセット 1 2 | 無 | 90 |
| 5 | プライマーセット 1 3 | 有 | 60 |
| 6 | プライマーセット 1 3 | 有 | 90 |
| 7 | プライマーセット 1 3 | 無 | 90 |

レーン 4 および 7 ではテンプレートが添加されていないため、未反応のプライマーが染色されたもの以外のバンドは確認されなかった。

レーン 2 および 5 ではテンプレートが添加されているため、未反応のプライマーと高分子サイズのテンプレートのバンドが確認された。しかし、反応時間が不十分であるため、增幅産物は確認されなかった。レーン 3 および 6 からわかるように、テンプレートが添加された反応時間 90 分のサンプルについては目的とする増幅産物が十分に得られた。低サイズのバンドのうち、約 260 bp 付近のバンドは、本発明の合成反応により予想される産物である。

例 3

本例では、鑄型として M13mp18RF DNA (ファージベクター：タカ

ラバイオ社製)を使用して、その増幅を試みた。用いたプライマーは、以下に示す通りとした。これらのプライマーの合成は、エスペックオリゴサービス株式会社に依頼した。

実験に使用したプライマーの特徴を以下に記載した。また、テンプレートに対する各プライマー領域の位置関係は図4に示す通りとした。なお、下記の配列において、下線部は、センスプライマーおよびアンチセンスプライマーのそれぞれにおいて共通の3'末端領域を示す。

プライマーセット14：プライマーの3'端側にある配列(24mer)が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(24mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の51塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと：プライマーの3'端側にある配列(22mer)が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(25mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の54塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーとの組み合わせ；

M13BIP : CGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACTGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT (配列番号27)

：

M13FIP : ACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGTGCGGGCCTTTCGCTATTAC (配列番号28)。

プライマーセット15：プライマーの3'端側にある配列(24mer:プライマーセット14と同様の配列)が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(13mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の1塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと：プライマーの3'端側にある配列(22mer:プライマーセット14と同様の配列)が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(13mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の1塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーとの組み合わせ；

M13F2L13-0 : GTGTGAAATTGTTGTGGAATTGTGAGCGGAT (配列番号29) :

M13R2L13-0 : TTCGCCAGCTGGCGTGGCCTTTCGCTATTAC (配列番号30)。

プライマーセット 16：プライマーの 3' 端側にある配列（24mer：プライマーセット 14 と同様の配列）が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列（13mer）が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3' 末端残基の 7 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと：プライマーの 3' 端側にある配列（22mer：プライマーセット 14 と同様の配列）が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列（13mer）が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3' 末端残基の 7 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーとの組み合わせ；

M13F2L13-6 : TTTCCCTGTGTGAATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT (配列番号 31) :

M13R2L13-6 : CCCCCCTTCGCCAGTGCGGGCCTTCGCTATTAC (配列番号 32)。

プライマーセット 17：プライマーの 3' 端側にある配列（24mer：プライマーセット 14 と同様の配列）が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列（13mer）が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3' 末端残基の 13 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと：プライマーの 3' 端側にある配列（22mer：プライマーセット 14 と同様の配列）が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列（13mer）が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3' 末端残基の 13 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーとの組み合わせ；

M13F2L13-12 : TAGCTGTTCCTGTGTTGTGGAATTGTGAGCGGAT (配列番号 33) :

M13R2L13-12 : AGCACATCCCCTGTGCGGGCCTTCGCTATTAC (配列番号 34)。

プライマーセット 18：プライマーの 3' 端側にある配列（24mer：プライマーセット 14 と同様の配列）が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列（13mer）が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3' 末端残基の 19 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと：プライマーの 3' 端側にある配列（22mer：プライマーセット 14 と同様の配列）が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列（13mer）が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3'

、末端残基の19塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーとの組み合わせ；

M13F2L13-18 : TGGTCATAGCTGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT (配列番号35) :

M13R2L13-18 : CCTTGCAGCACATGTGCGGGCCTTCGCTATTAC (配列番号36)。

プライマーセット19：プライマーの3'端側にある配列(24mer:プライマーセット14と同様の配列)が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(13mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の25塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと：プライマーの3'端側にある配列(22mer:プライマーセット14と同様の配列)が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(13mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の23塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーとの組み合わせ；

M13F2L13 : TAATCATGGTCATTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT (配列番号37) :

M13R3L13 : TCGCCTTGCAGCAGTGCGGGGCCTTCGCTATTAC (配列番号38)。

プライマーセット20：プライマーの3'端側にある配列(24mer:プライマーセット14と同様の配列)が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(23mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の25塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと：プライマーの3'端側にある配列(22mer:プライマーセット14と同様の配列)が鑄型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(23mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の23塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーとの組み合わせ；

M13F2L23 : CTCGAATTCGTAATCATGGTCATTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT (配列番号39) :

M13R3L23 : CCCAACTTAACTGCCTTGCAGCAGTGCGGGGCCTTCGCTATTAC (配列番号40)。

次の組成を有する反応液(25μL) : Tris-HCl(20mM, pH8.8)、KCl(10mM)、(NH₄)₂SO₄(10mM)、MgSO₄(2m

M)、Triton X-100 (0.1%)、dNTP (0.4 mM)、それ
ぞれ100 pmolの上記のプライマー対および0.05 μgの鑄型DNA、さ
らに8 UのBst DNAポリメラーゼ (NEW ENGLAND BioLab
s.) を含有；を調製し、これを65°Cで20～120分間インキュベートした。

各反応液5 μlについて、3% NuSieve GTG Agarose (BMA社製；タカラバ
イオ社より購入；「NuSieve」はBMA社の登録商標である) にて電気泳動を行
った。結果は図9および図10に示すとおりである。これらの図における各レー
ンのサンプルは下記の表5および表6に示す通りである。

表5：図9の電気泳動写真における泳動レーンの説明

| レーン | プライマー | テンプレート | 反応時間 (分) |
|-----|--------------------------------|--------|----------|
| 1 | DNA size marker (20 bp ladder) | | |
| 2 | プライマーセット14 | 有 | 60 |
| 3 | プライマーセット14 | 有 | 90 |
| 4 | プライマーセット14 | 有 | 120 |
| 5 | プライマーセット14 | 無 | 120 |
| 6 | プライマーセット15 | 有 | 60 |
| 7 | プライマーセット15 | 有 | 90 |
| 8 | プライマーセット15 | 有 | 120 |
| 9 | プライマーセット15 | 無 | 120 |
| 10 | プライマーセット16 | 有 | 20 |
| 11 | プライマーセット16 | 有 | 40 |
| 12 | プライマーセット16 | 有 | 60 |
| 13 | プライマーセット16 | 無 | 60 |
| 14 | プライマーセット17 | 有 | 20 |
| 15 | プライマーセット17 | 有 | 40 |
| 16 | プライマーセット17 | 有 | 60 |
| 17 | プライマーセット17 | 無 | 60 |
| 18 | プライマーセット18 | 有 | 20 |
| 19 | プライマーセット18 | 有 | 40 |
| 20 | プライマーセット18 | 有 | 60 |
| 21 | プライマーセット18 | 無 | 60 |

表6：図10の電気泳動写真における泳動レーンの説明

| レーン | プライマー | テンプレート | 反応時間（分） |
|-----|--------------------------------|--------|---------|
| 1 | DNA size marker (20 bp ladder) | | |
| 2 | プライマーセット19 | 有 | 20 |
| 3 | プライマーセット19 | 有 | 40 |
| 4 | プライマーセット19 | 有 | 60 |
| 5 | プライマーセット19 | 無 | 60 |
| 6 | プライマーセット20 | 有 | 20 |
| 7 | プライマーセット20 | 有 | 40 |
| 8 | プライマーセット20 | 有 | 60 |
| 9 | プライマーセット20 | 無 | 60 |

各図のレーン5、9、13、17、および21ではテンプレートが添加されていないため、未反応のプライマーが染色されたもの以外のバンドは確認されなかった。

図9のレーン3および4ではテンプレートが添加されており、反応時間90分以上で増幅産物が得られた。しかし、これは、目的のサイズとは異なる低サイズのラダー状の増幅産物であった。これらのレーンでは、増幅反応にプライマーセット14が用いられている。そのプライマー伸長鎖上における、プライマーの3'末端側配列に相当する領域と5'末端側配列がハイブリダイズする領域との間隔は、センスプライマーでは50ヌクレオチドであり、アンチセンスプライマーでは53ヌクレオチドである。このことから、プライマー伸長鎖上における、プライマーの3'末端側配列に相当する領域と5'末端側配列がハイブリダイズする領域との間隔が過度に大きくなると、各プライマーの5'端側にある配列が折り返す効率が顕著に低下し、本発明の合成反応が起こりにくくなるために、目的とする増幅産物が得られなかつたものと考えられる。

図9のレーン7からわかるように、プライマーセット15を用いた場合、90

分以上の反応時間で目的増幅産物を得ることが可能であった。低サイズのバンドのうち、約240 bp付近のバンドは、本発明の合成反応により予想される産物である。

さらに、図9のレーン12および16、ならびに図10のレーン4および8からわかるように、プライマーセット16、17、19、および20を用いた場合、60分の反応時間で目的増幅産物を得ることが可能であった。低サイズのバンドのうち、約240 bp付近のバンドは、本発明の合成反応により予想される産物である。

さらに、図9のレーン19からわかるように、プライマーセット18を用いた場合、40分以上の反応時間で目的増幅産物を得ることが可能であった。低サイズのバンドのうち、約240 bp付近のバンドは、本発明の合成反応により予想される産物である。

プライマーセット15のように、そのプライマー伸長鎖上における、プライマーの3'末端側配列に相当する領域と5'末端側配列がハイブリダイズする領域との間隔が小さい場合には、同一の配列を有する次のプライマーがアニーリングすべき鑄型上の配列の大部分が二本鎖のままとなり、次のプライマーのアニーリングが困難になるために、長い反応時間が必要になると考えられる。

また、プライマーセット19および20のように、そのプライマー伸長鎖上における、プライマーの3'末端側配列に相当する領域と5'末端側配列がハイブリダイズする領域との間隔が大きい場合には、各プライマーの5'端側の配列が折り返す効率が低下し、比較的長い反応時間が必要になるとと考えられる。

一方で、プライマーセット18のように、そのプライマー伸長鎖上における、プライマーの3'末端側配列に相当する領域と5'末端側配列がハイブリダイズする領域との間隔が小さすぎず、かつ、大きすぎない距離にある時に、本発明における最も効率のよい増幅が可能となると考えられる。

例4

例1～3で得られた増幅産物のうち、それぞれのターゲットごとに最も増幅効率が良かったと思われる増幅産物を用い、制限酵素で消化した。例1に記載のブ

ライマーセット 5 を用いて得られた増幅産物の反応液 1 μ L を制限酵素 Mbo I で消化し、例 2 に記載のプライマーセット 12 を用いて得られた増幅産物の反応液 1 μ L を制限酵素 Bst XI で消化し、例 3 に記載のプライマーセット 18 を用いて得られた増幅産物の反応液 1 μ L を制限酵素 Pst I で消化した。制限酵素消化の条件は、37 °C で 3 時間とした。

各消化物について、3% NuSieve GTG Agarose (BMA社製；タカラバイオ社より購入；「NuSieve」はBMA社の登録商標である) にて電気泳動を行った。結果は図 11、図 12、および図 13 に示すとおりである。それぞれの塩基配列から推測される各制限酵素消化断片のサイズは、泳動写真の横に記したとおりである。未消化でのバンドのほとんどが消化後に推定されるサイズのバンドへ変化したことから、目的の増幅産物が得られていることが確認された。

例 5：各種融解温度調整剤の効果

増幅反応溶液に各種融解温度調整剤を添加して増幅反応を行ない、増幅効率に対する融解温度調整剤の効果を検討した。例 1 と同様に、鑄型として Human DNA (Clontech社製) を使用してヒト STS DYS237 遺伝子の増幅を試みた。用いたプライマーは、例 1 で最も良好な増幅効率を示したプライマーセット 5 (配列番号 9 および配列番号 10) とした。

次の組成を有する反応液 (25 μ L) : Tris-HCl (20 mM, pH 8.8)、KCl (10 mM)、(NH₄)₂SO₄ (10 mM)、MgSO₄ (8 mM)、Triton X-100 (0.1%)、dNTP (1.4 mM)、それそれ 1600 nM の上記プライマー対、および鑄型DNA、さらに 16 U の Bst DNA ポリメラーゼ (NEW ENGLAND BioLabs) を含有；を調製した。鑄型DNAの濃度は、100 ng、10 ng、1 ng、または 0 ng とした。この反応液に、さらに、最終濃度として、6%DMSO、0.5Mベタイン、4%ホルムアミド、または 10%グリセロールを添加した。これを 60 °C で 90 分間インキュベートした。

増幅反応後、実施例 1 と同様に電気泳動を行った。結果は図 14 に示すとおりである。図 14 における各レーンのサンプルは下記の表 7 示す通りである。

表7：図14の電気泳動写真における泳動レーンの説明

| レーン | 融解温度調整剤 | テンプレートの量 |
|-----|--------------------------------|----------|
| 1 | DNA size marker (20 bp ladder) | |
| 2 | 6 %DMSO | 100 ng |
| 3 | 0.5Mペタイン | 100 ng |
| 4 | 4 %ホルムアミド | 100 ng |
| 5 | 10 %グリセロール | 100 ng |
| 6 | 無 | 100 ng |
| 7 | 6 %DMSO | 10 ng |
| 8 | 0.5Mペタイン | 10 ng |
| 9 | 4 %ホルムアミド | 10 ng |
| 10 | 10 %グリセロール | 10 ng |
| 11 | 無 | 10 ng |
| 12 | 6 %DMSO | 1 ng |
| 13 | 0.5Mペタイン | 1 ng |
| 14 | 4 %ホルムアミド | 1 ng |
| 15 | 10 %グリセロール | 1 ng |
| 16 | 無 | 1 ng |
| 17 | 6 %DMSO | 無 |
| 18 | 0.5Mペタイン | 無 |
| 19 | 4 %ホルムアミド | 無 |
| 20 | 10 %グリセロール | 無 |
| 21 | 無 | 無 |
| 22 | DNA size marker (20 bp ladder) | |

図14において、約160 bp付近のバンドが本発明の合成反応により予想される增幅産物である。図14から明らかのように、100 ngの鑄型DNAを用いた場合には、融解温度調整剤の有無にかかわらず増幅産物が得られた。一方で、10 ngの鑄型DNAを用いた場合には、融解温度調整剤を添加した場合にのみ

増幅産物が得られた。さらに、1ngの鑄型DNAを用いた場合にも、融解温度調整剤を添加した場合にのみ増幅産物のバンドが確認され、特に、融解温度調整剤としてDMSO(6%)を添加した場合に最も明確な増幅産物のバンドが確認された。

以上の結果から、本発明による核酸増幅方法において、DMSO、ベタイン、ホルムアミド、グリセロールなどの融解温度調整剤を反応液に添加することにより増幅効率が向上し、特に、DMSOを添加した場合に良好な増幅効率が得られると考えられる。

請求の範囲

1. 鑄型核酸中の標的核酸配列と相補的な核酸を合成する方法であって、
 - (a) 標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含んでなり、標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含んでなるプライマーであって、

プライマー中において前記配列(Ac')と前記配列(B')との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列(Ac')の塩基数をXとし、標的核酸配列中における前記配列(A)と前記配列(B)に挟まれた領域の塩基数をYとしたときに、 $(X - Y) / X$ が-1.00~1.00の範囲にあり、

プライマー中において前記配列(Ac')と前記配列(B')との間に介在配列が存在する場合には、XおよびYを前記の通りとし、該介在配列の塩基数をY'としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$ が-1.00~1.00の範囲にあるプライマーを用意する工程、
 - (b) 鑄型核酸を用意する工程、
 - (c) 前記プライマーを前記鑄型核酸にアニーリングさせ、プライマー伸長反応を行なって前記標的核酸配列の相補配列を含む相補核酸を合成する工程、
 - (d) 工程(c)により合成された相補核酸の5'側に存在する配列(B')を同相補核酸上に存在する配列(Bc)にハイブリダイズさせ、これにより、鑄型核酸上の前記配列(A)の部分を一本鎖とする工程、および
 - (e) 工程(d)により一本鎖とされた鑄型核酸上の前記配列(A)の部分に、前記プライマーと同一の配列を有する他のプライマーをアニーリングさせて鎖置換反応を行なうことにより、工程(c)により合成された相補核酸を、前記他のプライマーにより新たに合成される相補核酸で置換する工程、
を含んでなる、方法。

2. 工程(e)により得られた二本鎖の核酸を工程(d)で繰り返して使用する、請求項1に記載の方法。

3. 工程（c）、工程（d）および工程（e）が等温で行われる、請求項1に記載の方法。

4. 鎮置換能を有するDNAポリメラーゼが使用される、請求項1に記載の方法。

5. 鑄型核酸がRNAである場合に、逆転写酵素を用いてcDNAを合成する工程をさらに含んでなる、請求項1に記載の方法。

6. 工程（c）、工程（d）および工程（e）が融解温度調整剤の存在下で行われる、請求項1に記載の方法。

7. 融解温度調整剤が、ジメチルスルホキシド、ベタイン、ホルムアミドもしくはグリセロール、またはこれらの混合物である、請求項6に記載の方法。

8. 鑄型核酸中の標的核酸配列が非天然ヌクレオチドを含んでなるものである、請求項1に記載の方法。

9. 二本鎖からなる鑄型核酸中の標的核酸配列を増幅する方法であって、
(a) 二本鎖鑄型核酸の第一鎖における標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含んでなる第一のプライマーであって、

プライマー中において前記配列(Ac')と前記配列(B')との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列(Ac')の塩基数をXとし、標的核酸配列中における前記配列(A)と前記配列(B)に挟まれた領域の塩基数をYとしたときに、 $(X - Y) / X$ が-1.00～1.00の範囲にあり、

プライマー中において前記配列（Ac'）と前記配列（B'）との間に介在配列が存在する場合には、XおよびYを前記の通りとし、該介在配列の塩基数をY'としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$ が-1.00～1.00の範囲にあるプライマーを用意する工程、

(b) 二本鎖型核酸の第二鎖における標的核酸配列の3'末端部分の配列(C)にハイブリダイズする配列(Cc')を3'末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列(C)よりも5'側に存在する配列(D)の相補配列(Dc)にハイブリダイズする配列(D')を前記配列(Cc')の5'側に含んでなる第二のプライマーであって、

プライマー中において前記配列(Cc')と前記配列(D')との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列(Cc')の塩基数をXとし、標的核酸配列中における前記配列(C)と前記配列(D)に挟まれた領域の塩基数をYとしたときに、 $(X - Y) / X$ が-1.00～1.00の範囲にあり、

プライマー中において前記配列(Cc')と前記配列(D')との間に介在配列が存在する場合には、XおよびYを前記の通りとし、該介在配列の塩基数をY'としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$ が-1.00～1.00の範囲にあるプライマーを用意する工程、

(c) 第一の鑄型核酸および第二の鑄型核酸からなる二本鎖型核酸を用意する工程、

(d) 前記第一および第二のプライマーをそれぞれ前記第一および第二の鑄型核酸にアニーリングさせ、それぞれプライマー伸長反応を行なって前記標的核酸配列の相補配列を含む第一および第二の相補核酸を合成する工程、

(e) 工程(d)により合成された第一および第二の相補核酸の5'側に存在する配列(B')および配列(D')を、同相補核酸上に存在する配列(Bc)および配列(Dc)にそれぞれハイブリダイズさせ、これにより、第一および第二の鑄型核酸上の前記配列(A)および配列(C)の部分を一本鎖とする工程、ならびに

(f) 工程(e)により一本鎖とされた第一および第二の鑄型核酸上の前記配列(A)および配列(C)の部分に、前記プライマーと同一の配列を有する他のプライマーをアニーリングさせて鎖置換反応を行なうことにより、工程(d)により

合成された第一および第二の相補核酸を、前記他のプライマーにより新たに合成される相補核酸で置換する工程、
を含んでなる、方法。

10. 工程 (f) により得られた二本鎖の核酸を工程 (e) で繰り返して使用する、請求項 9 に記載の方法。

11. 工程 (f) により一本鎖の核酸として得られた第一および第二の相補核酸を、工程 (d) においてそれぞれ第二および第一の鑄型核酸として繰り返して使用する、請求項 9 に記載の方法。

12. 工程 (d)、工程 (e) および工程 (f) が等温で行われる、請求項 9 に記載の方法。

13. 鎖置換能を有するDNAポリメラーゼが使用される、請求項 9 に記載の方法。

14. 鑄型核酸がRNAの場合に、逆転写酵素を用いてcDNAを合成する工程をさらに含んでなる、請求項 9 に記載の方法。

15. 工程 (d)、工程 (e) および工程 (f) が融解温度調整剤の存在下で行われる、請求項 9 に記載の方法。

16. 融解温度調整剤が、ジメチルスルホキシド、ベタイン、ホルムアミドもしくはグリセロール、またはこれらの混合物である、請求項 15 に記載の方法。

17. 鑄型核酸中の標的核酸配列が非天然ヌクレオチドを含んでなるものである、請求項 9 に記載の方法。

18. 鑄型核酸中の標的核酸配列と相補的な核酸を合成するためのプライマーであって、

標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含んでなり、標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含んでなり、

プライマー中において前記配列(Ac')と前記配列(B')との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列(Ac')の塩基数をXとし、標的核酸配列中における前記配列(A)と前記配列(B)に挟まれた領域の塩基数をYとしたときに、 $(X - Y) / X$ が-1.00～1.00の範囲にあり、

プライマー中において前記配列(Ac')と前記配列(B')との間に介在配列が存在する場合には、XおよびYを前記の通りとし、該介在配列の塩基数をY'としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$ が-1.00～1.00の範囲にある、プライマー。

19. 請求項18に記載のプライマーを含んでなる、鑄型核酸中の標的核酸配列と相補的な核酸を合成するためのキット。

20. 二本鎖からなる鑄型核酸中の標的核酸配列を増幅するためのプライマーセットであって、

(a) 二本鎖鑄型核酸の第一鎖における標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含んでなる第一のプライマーであって、

プライマー中において前記配列(Ac')と前記配列(B')との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列(Ac')の塩基数をXとし、標的核酸配列中における前記配列(A)と前記配列(B)に挟まれた領域の塩基数をYとしたときに、 $(X - Y) / X$ が-1.00～1.00の範囲にあり、

プライマー中において前記配列（Ac'）と前記配列（B'）との間に介在配列が存在する場合には、XおよびYを前記の通りとし、該介在配列の塩基数をY'としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$ が-1.00～1.00の範囲にある、第一のプライマー、および

(b) 二本鎖錆型核酸の第二鎖における標的核酸配列の3'末端部分の配列(C)にハイブリダイズする配列(Cc')を3'末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列(C)よりも5'側に存在する配列(D)の相補配列(Dc)にハイブリダイズする配列(D')を前記配列(Cc')の5'側に含んでなる第二のプライマーであって、

プライマー中において前記配列(Cc')と前記配列(D')との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列(Cc')の塩基数をXとし、標的核酸配列中における前記配列(C)と前記配列(D)に挟まれた領域の塩基数をYとしたときに、 $(X - Y) / X$ が-1.00～1.00の範囲にあり、

プライマー中において前記配列(Cc')と前記配列(D')との間に介在配列が存在する場合には、XおよびYを前記の通りとし、該介在配列の塩基数をY'としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$ が-1.00～1.00の範囲にある、第二のプライマー、

を含んでなる、プライマーセット。

21. 請求項20に記載のプライマーセットを含んでなる、二本鎖からなる錆型核酸中の標的核酸配列を増幅するためのキット。

1114

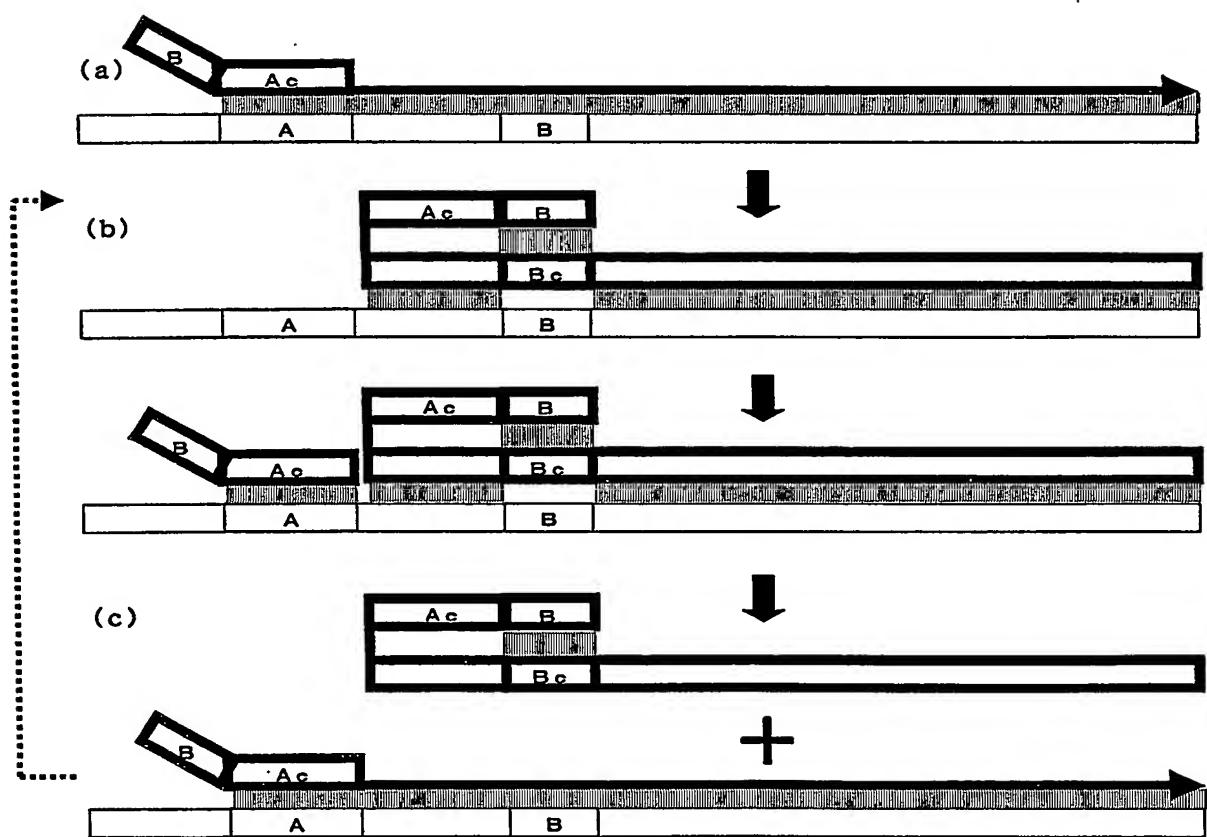


FIG. I

2/14

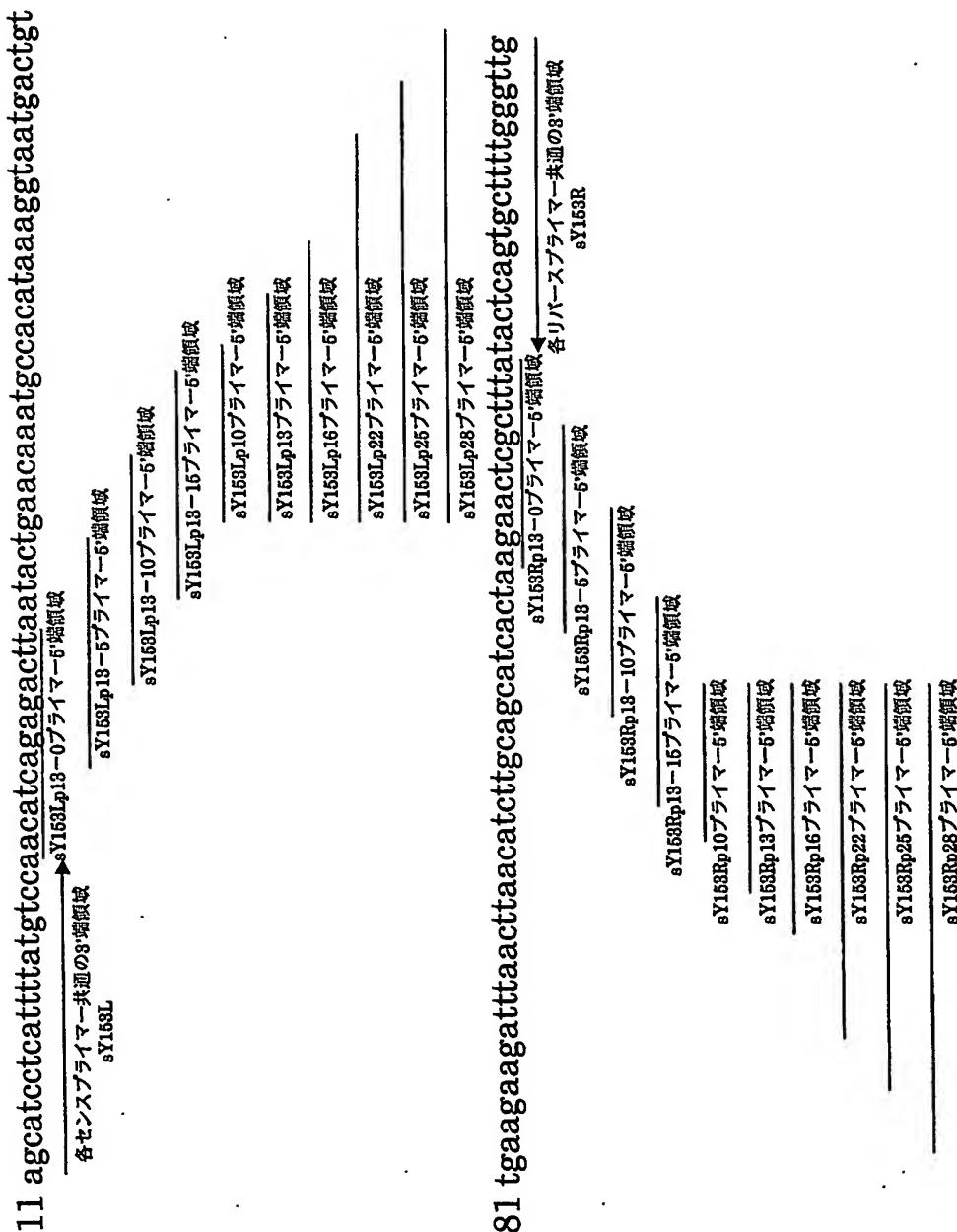


FIG. 2

3/14

21 gctacgggtctcgaaatggaaaatataatggaaatggaaatgnaacggaaatcgaatgtcatagaatgtaaatgcggaa
各センスプライマー共通の3'端領域
↓
sY160Lp18プライマー-5'端領域
↓
sY160Lp16プライマー-5'端領域

101 tgcaaaaacatggaaatccaaaatcattgactgaaaggctggtgtcgaaaggaaatttgactcoaatggaaatggaaatcgaa

181 tggaaatggaaagtggaaatcgaaacttaatcgaaatggaaatttgatagggaaacggaaatggaaaggaaatgtcaatgttt
各リバースプライマー共通の3'端領域
↑
sY160Rp18プライマー-5'端領域
↑
sY160Rp16プライマー-5'端領域

FIG. 3

4/14

6121 cactat tag gcacccagg ctttacactt tatgtttccg gctcgatgt tggtggaa

各センスプライマー共通の3'端領域

6181 tgtgagcggtaacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgatccg attcgacct

M13F2L13-0'プライマー-5'端領域
M13R2L13-6'プライマー-5'端領域
M13R2L13-12'プライマー-5'端領域
M13F2L13-18'プライマー-5'端領域
M13R2L13'プライマー-5'端領域
M13R2L23'プライマー-5'端領域

6241 cggtaacccggggatccta gatgcgacct gcaggcatgc aagtttggca ctggccgttcg

M13BIP'プライマー-5'端領域

6301 ttttacaaacgttgtgactgg gaaaaaccctg gggttaccca actttatcgcc ttgtcaggcac

M13F1P'プライマー-5'端領域
M13R2L13-12'プライマー-5'端領域
M13R2L13-18'プライマー-5'端領域
M13R2L13'プライマー-5'端領域
M13R2L23'プライマー-5'端領域

6361 atccccctt cggccaggctt cgttaatacg cg aagggcccg caccgatcgcc ccttccaa

M13R2L13-0'プライマー-5'端領域
M13R2L13-6'プライマー-5'端領域
M13R2L13-12'プライマー-5'端領域
M13R2L13-18'プライマー-5'端領域

FIG. 4

5/14

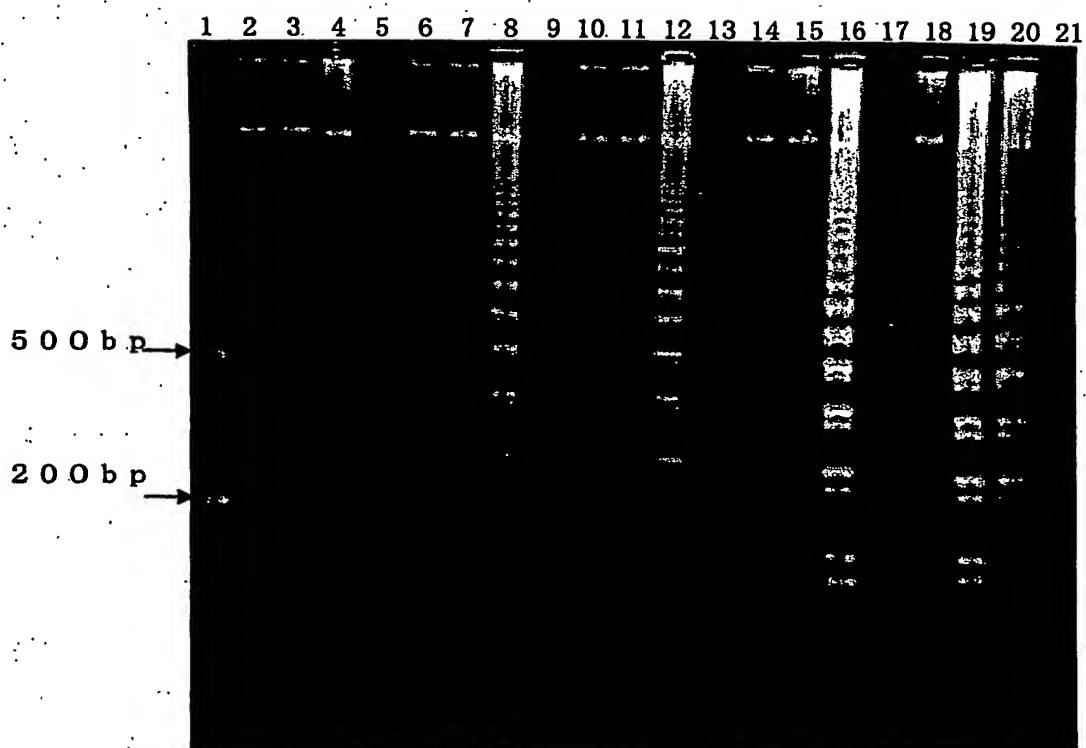


FIG. 5

6/14

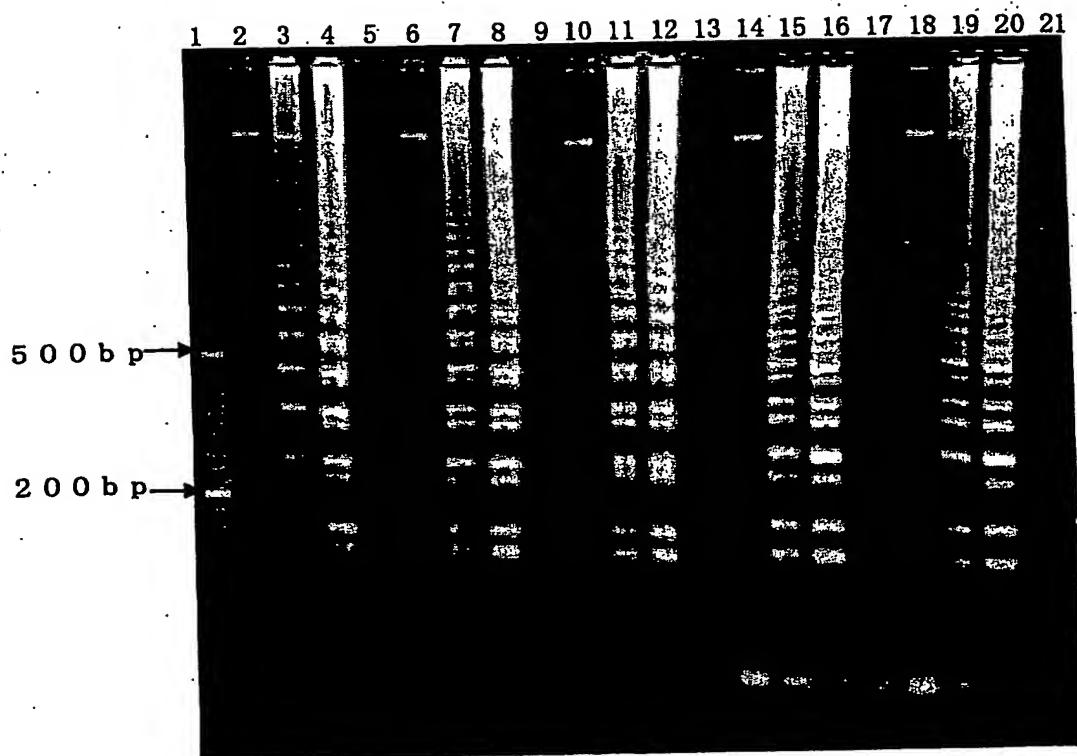


FIG. 6

7/14

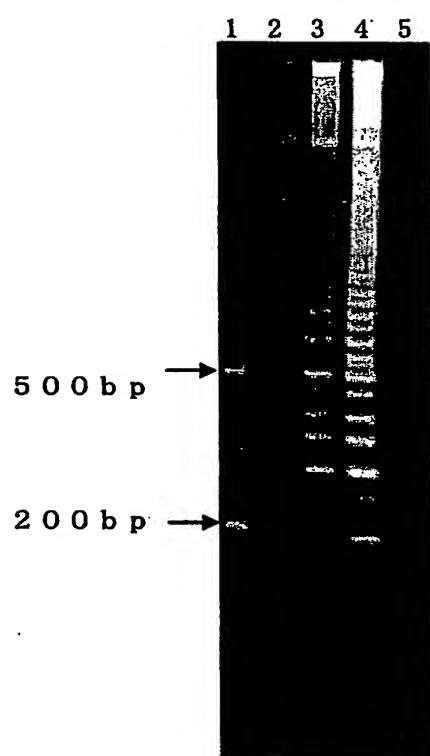


FIG. 7

8/14

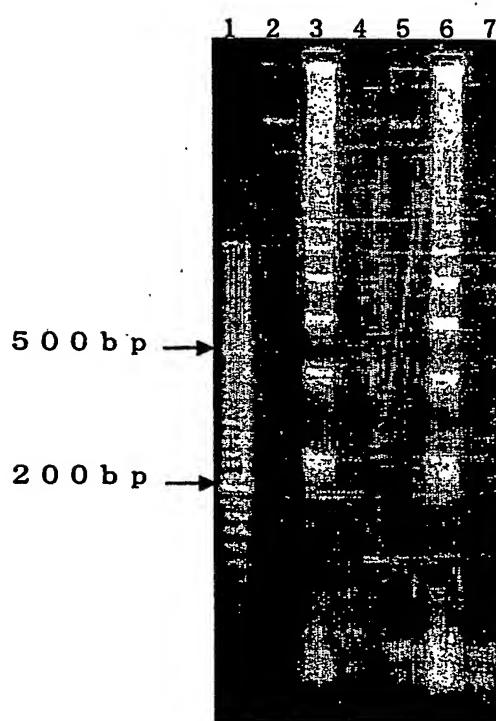


FIG. 8

9/14

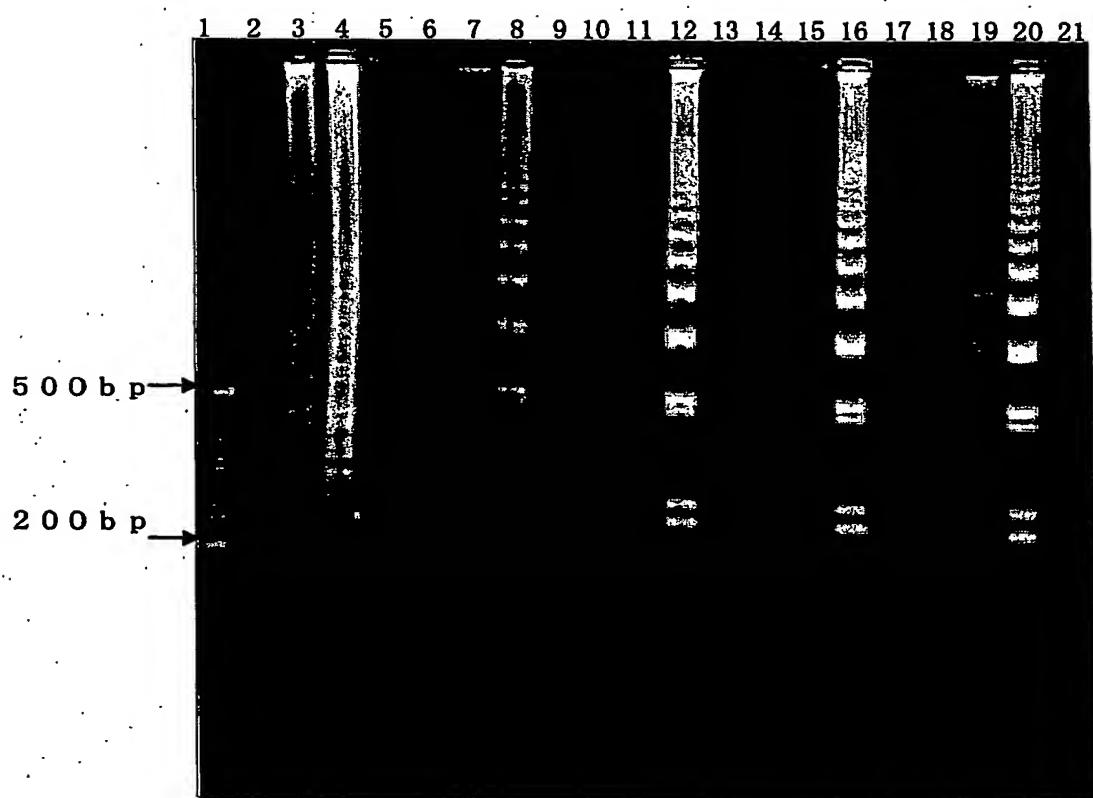


FIG. 9

10/14

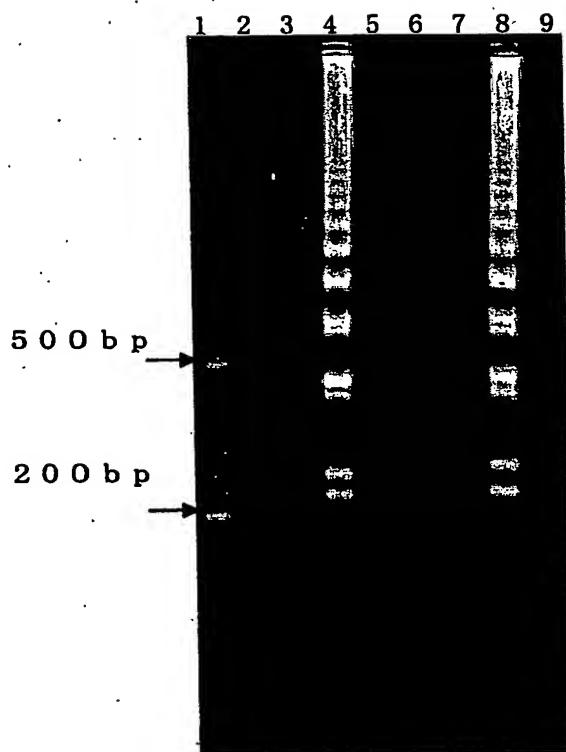
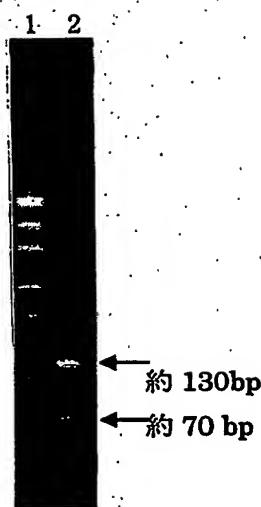


FIG. 10

11/14

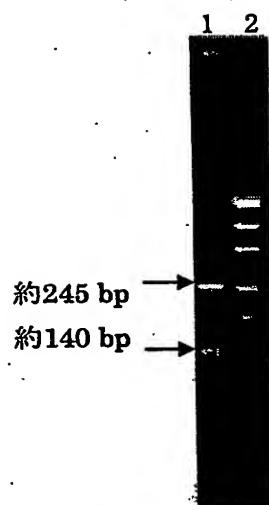


レーン1 : DNA size marker (pUC19-HpaII)

レーン2 : 制限酵素処理されたヒト STS DYS 237 の增幅産物

FIG. 11

12/14

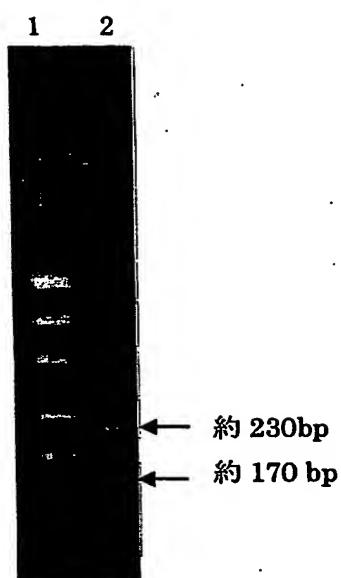


レーン1：制限酵素処理された s Y 1 6 0 の増幅産物

レーン2：DNA size marker (pUC19-HpaII)

F I G. 12

13 / 14



レーン1 : DNA size marker (pUC19-HpaII)

レーン2 : 制限酵素処理されたM 1 3 m p 1 8 の増幅産物

F I G. 13

14/14

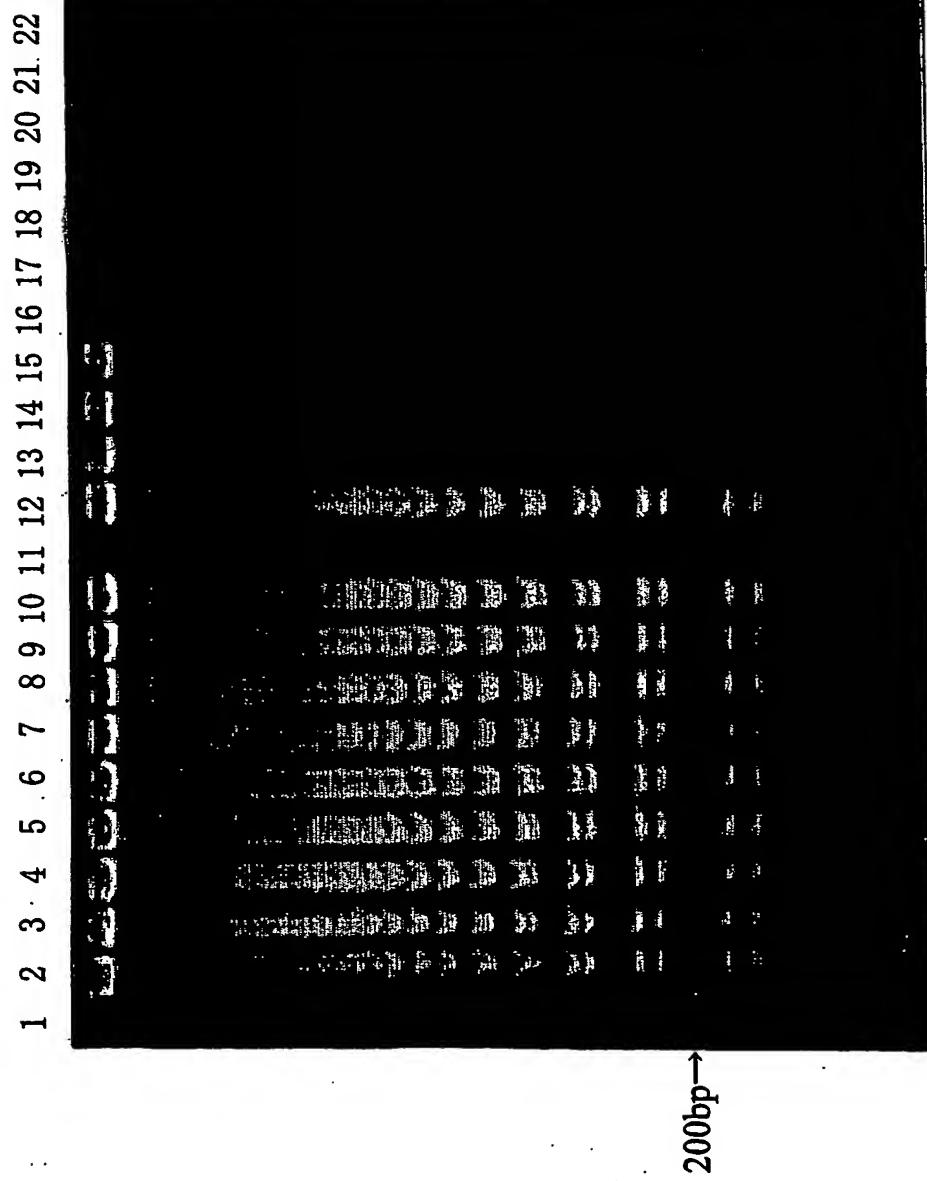


FIG. 14

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

K.K. Dnaform

Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Method for Amplification of Nucleic Acids

<130> 145062

<150> JP 2002-314776

<151> 2002-10-29

<160> 43

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 1

gcatcctcat tttatgtcca

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 2

caacccaaaaa gcactgagta

20

<210> 3

<211> .31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 3

aagtctctga tgtgcattcct cattttatgt cca

33

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 4

agaactcgct ttacaaccca aaagcactga gta

33

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 5

gtattaaggc tctgcattcct cattttatgt cca

33

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 6

cactaagaac tcgcaaccca aaagcactga gta

33

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 7

gttcagtatt aaggcatcct catttatgt cca 33

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 8

agcatcacta agacaaccca aaagcactga gta 33

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 9

catttggta gtagcatcct catttatgt cca 33

5/18

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 10

cttgcagcat caccaaccca aaagcactga gta

33

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 11

ggcattttgtt gcatcctcat tttatgtcca

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 12

atcttgcagc caacccaaaa gcactgagta

30

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 13

tgtggcattt gttgcattcct cattttatgt cca

33

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 14

aacatcttgc agccaaaccca aaaggactga gta

33

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 15

ttatgtggca tttgttgcac cctcatttta tgtcca

36

<210> 16

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 16

cttaacatct tgcagccaac ccaaaaggcac tgtagta

36

<210> 17

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 17

ttaccttat gtggcatttg ttgcattcctc attttatgtc ca

42

<210> 18

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 18

attnaactta acatcttgca gccaaacccaa aagcactgag ta 42

<210> 19

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 19

tcattacatt tatgtggcat ttgttgcatc ctcattttat gtcca 45

<210> 20

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

9/18

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 20

aagatttaac ttaacatctt gcagccaacc caaaaaggcact gagta 45

<210> 21

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 21

cagtcattac ctttatgtgg catttggc atcctcattt tatgtcca 48

<210> 22

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 22

aagaagattt aacttaacat cttgcagcca acccaaaagc actgagta 48

<210> 23

<211> 33

10/18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 23

attcgattcc gtttacgggt ctcgaatgga ata

33

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 24

ctaaatcgaa tggtcattgc attccttcc att

33

<210> 25

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 25

11/18

gacattcgat tccgttacg ggtctcgaat ggaata 36

<210> 26

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 26

gaactaaatc gaatggcat tgcattcctt tccatt 36

<210> 27

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 27

cgactctaga ggatccccgg gtactgttgt gtggaattgt gagcggat 48

<210> 28

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

12/18

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 28

acaacgtcgt gactggaaa accctgtcg gcgcctttcg ctattac

47

<210> 29

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 29

gtgtgaaatt gtttgttg tggaatttg agcggat

37

<210> 30

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 30

ttcgccagct gggtgcggg cctttcgct attac

35

<210> 31

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 31

tttcctgtgt gaatgttgtg tggaatttgtg agcggat

37

<210> 32

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 32

ccccctttcg ccagtgcggg cctcttcgct attac

35

<210> 33

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

14/18

<400> 33

tagctgttgc ctgtgttgtg tggaattgtg agcggat

37

<210> 34

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 34

agcacatccc cctgtgcggg cctcttcgct attac

35

<210> 35

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 35

tggcatagc tgggttgttg tggaattgtg agcggat

37

<210> 36

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 36

ccttgcagca catgtgcggg cctcttcgct attac 35

<210> 37

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 37

taatcatgtt catttgttg tgaaattgtg agcggat 37

<210> 38

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 38

tgcgcattgca gcagtgcggg cctcttcgct attac 35

<210> 39

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 39

ctcgaattcg taatcatggc cattgttgtg tggaattgtg agcggat

47

<210> 40

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 40

cccaacttaa tcgccttgca gcagtgcggg cctcttcgct attac

45

<210> 41

<211> 140

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

agcatcctca ttttatgtcc aacatcagag acttaatact gaacaaatgc cacataaagg 60

17/18

taatgactgt tgaagaagat ttaacttaac atcttgcagc atcactaaga actcgctta 120
tactcagtgc ttttgggttg 140

<210> 42

<211> 240

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> unsure

<222> (48)

<223> n is unknown

<400> 42

gctacgggtc tcgaatggaa taaaaatata tgaaatggaa tgcaatgnaa cggaatcgaa 60
tgtcatagaa tgtaatgcaa tgcaaaaaca tgaaatccaa aatcattgac tggaaaggct 120
gggtgtcgaa aggaattgac tccaatggaa tgaaatcgaa tgaaatggaa gtgaatagaa 180
tcgaactaaa tcgaatggaa tgaaattgat aggaacggaa tggaaaggaa tgcaatgatt 240

<210> 43

<211> 300

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Phage vector

<400> 43

cactcattag gcaccccagg cttaacatt tatgcttccg gctcgatgt tgtgtgaaat 60

18/18

tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 120
cgttaccgg ggatccctcta gagtcgacct gcaggcatgc aagcttggca ctggccgtcg 180
tttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc cttgcagcac 240
atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggccccg caccgatcgc cttcccaac 300

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No. PCT/JP03/13856 |
|---|

| |
|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53, G01N33/566 |
|---|

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

| |
|--------------------|
| B. FIELDS SEARCHED |
|--------------------|

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/00-90, C12Q1/00-70, G01N33/98

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

| |
|--|
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |
|--|

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | Tsugunori Notomi et al., "Loop-mediated isothermal amplification of DNA.", Nucleic Acids Research, Vol.28, No.12, (2000) E63 | 1-21 |
| P, A | JP 2002-345499 A (EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA), 03 December, 2002 (03.12.02), (Family: none) | 1-21 |
| A | WO 2001/077317 A1 (EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA), 18 October, 2001 (18.10.01), & EP 1275715 A1 & US 2003/0207292 A1 | 1-21 |
| A | WO 2002/016639 A1 (TAKARA BIO INC.), 28. February, 2002 (28.02.02), & EP. 1312682 A1 & US 2003/0073081 A1 | 1-21 |

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

| | | |
|---|-----|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" | later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" | document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |

| | |
|---|--|
| Date of the actual completion of the international search 02 February, 2004 (02.02.04) | Date of mailing of the international search report 17 February, 2004 (17.02.04) |
|---|--|

| | |
|--|--------------------|
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | Authorized officer |
|--|--------------------|

| | |
|---------------|---------------|
| Facsimile No. | Telephone No. |
|---------------|---------------|

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53, G01N33/566

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12N15/00-90, C12Q1/00-70, G01N33/00-98

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| A | Tsugunori Notomi et al., "Loop-mediated isothermal amplification of DNA." Nucleic Acids Research, Vol.28, No.12, (2000) E63 | 1-21 |
| PA | JP 2002-345499 A (EIKEN KAGAKU K.K.) 2002.12.03 (ファミリーなし) | 1-21 |
| A | WO 2001/077317 A1 (EIKEN KAGAKU K.K.) 2001.10.18 & EP 1275715 A1 & US 2003/0207292 A1 | 1-21 |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.02.2004

国際調査報告の発送日

17.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

齊藤 真由美

4B 8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) 関連すると認められる文献 | | |
|---------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | WO 2002/016639 A1 (TAKARA BIO INC.) 2002.02.28 & EP 1312682 A1 & US 2003/0073081 A1 | 1-21 |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.